

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E  
PARASITOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**PRODUÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS E  
DESENVOLVIMENTO DE IMUNOENSAIOS PARA A  
DETECÇÃO DO VÍRUS DA MIONECROSE INFECCIOSA  
DE CAMARÕES PENEÍDEOS**

**CAROLINE HEIDRICH SEIBERT**

**FLORIANÓPOLIS  
2011**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E  
PARASITOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**Produção de anticorpos monoclonais e desenvolvimento de  
imunoensaios para a detecção do vírus da mionecrose  
infecciosa de camarões peneídeos**

**CAROLINE HEIDRICH SEIBERT**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia da Universidade  
Federal de Santa Catarina como requisito parcial  
para a obtenção do título de Mestre em  
Biotecnologia. Área de concentração:  
Biotecnologia aplicada à saúde

**Orientador: Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto**

**FLORIANÓPOLIS  
2011**

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

S457p Seibert, Caroline Heidrich  
Produção de anticorpos monoclonais e desenvolvimento de  
imunoensaios para a detecção do vírus da mionecrose  
infecciosa de camarões peneídeos [dissertação] / Caroline  
Heidrich Seibert ; orientador, Aguinaldo Roberto Pinto.  
- Florianópolis, SC, 2011.  
127 p.: ils., grafs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia.

Inclui referências

1. Biotecnologia. 2. Mionecrose infecciosa. 3. Proteínas.  
4. Anticorpos monoclonais. 5. Imunoensaio. 6. Penaeidae.  
I. Pinto, Aguinaldo Roberto. II. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III.  
Título.

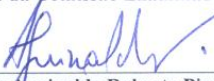
CDU 577.23

“Produção de anticorpos monoclonais e desenvolvimento de  
imunoensaios para a detecção do vírus de mionecrose infecciosa de  
camarões peneídeos” POR

**CAROLINE HEIDRICH SEIBERT**

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final, pelo Orientador e  
membros da Comissão Examinadora.

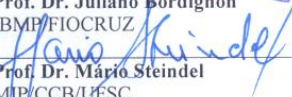
Orientador:


  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto**  
MIP/CCB/UFSC

Comissão Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Luciane Maria Perazzolo**  
BEC/CCB/UFSC

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Juliano Bordignon**  
IBMP/FIOCRUZ

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Mario Steindel**  
MIP/CCB/UFSC

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr.ª Cláudia Maria Oliveira Simões – CIF/CCS/UFSC**  
Coordenadora do Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências/CCB/ UFSC  
Florianópolis, Março de 2011.



Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia Aplicada, em colaboração com o Laboratório de Protozoologia, ambos do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina, sob orientação do Prof. Dr. Aguinaldo Roberto Pinto, com recursos financeiros da *International Foundation for Science* (IFS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Ministério da Agricultura e Pesca e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).





*“Existe somente uma idade para a gente ser feliz. Somente uma época na vida de cada pessoa em que é possível sonhar e fazer planos e ter energia bastante para realizá-los, a despeito de todas as dificuldades e obstáculos.*

*Uma só idade para a gente se encantar com a vida e viver apaixonadamente e desfrutar tudo com toda intensidade sem medo nem culpa de sentir prazer.*

*Fase dourada em que a gente pode criar e recriar a vida à nossa própria imagem e semelhança e vestir-se com todas as cores e experimentar todos os sabores.*

*Tempo de entusiasmo e coragem em que todo desafio é mais um convite à luta que a gente enfrenta com toda disposição de tentar algo novo, de novo e de novo, e quantas vezes for preciso.*

*Essa idade tão fugaz na vida da gente chama-se presente, também conhecida como ‘agora’ ou ‘já’ e tem a duração do instante que passa.”*

**Mário Quintana**



## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Aguinaldo R. Pinto, eu sou muito grata pela confiança, dedicação e pelo esforço em fazer eu aproveitar ao máximo as oportunidades dessa etapa da minha vida. Sobre tudo muito obrigada pela sua amizade e cumplicidade que tornaram a nossa convivência muito prazerosa. Ao longo desses anos, eu tive o privilégio de conhecer a pessoa especial que você é e, por isso, espero que futuramente compartilhem muitas conquistas e momentos de alegria.

Ao Prof. Dr. Carlos R. Zanetti agradeço pelas inúmeras pausas no trabalho para boas conversas que me demonstraram toda a sua sabedoria e compaixão. Esses momentos me proporcionaram desenvolver meu senso crítico e refletir diante de diversos temas, tornando-me uma pessoa mais compassiva, espiritualizada e compreensiva diante de nossas individualidades.

Aos antigos e atuais integrantes do Laboratório de Imunologia Aplicada que foram importantes ao longo desses anos, eu sou grata por todo o auxílio nos experimentos, pelos momentos de diversão e pela convivência harmoniosa no ambiente de trabalho: Sílvia Lanza, Camila Zanluca, Mariana Borsa, Elis A. Rosa, Tiago Gräf, Gisele Pasetti, Elayne Pereira, Álvaro J. Celmer, Ênio Bassi, Luan R. P. Aires, Yuri Tonello, Eduardo Koerich, Artur Battisti Neto, Jonatan Ersching, Rafael D. da Rosa, Douglas Bardini, Fernando M. Freire.

Aos servidores e professores da Universidade Federal de Santa Catarina e do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, bem como aos financiadores desse projeto e da minha bolsa de estudos, agradeço pela oportunidade de trilhar os caminhos do conhecimento, proporcionar-me um bom ensino, uma boa estrutura e o financiamento requerido.

Agradeço a todos os colegas da pós-graduação, em especial à Vanessa Moresco, amiga querida que está sempre presente desde os

tempos de graduação, e ao Tiago Gräf, companheiro de bancada e de aulas (da pós-graduação e de canto).

Gostaria de agradecer a banca examinadora desta dissertação pela disponibilidade e dedicação nas correções deste trabalho: Prof. Dra. Luciane Perazzolo, Dra. Elayne Pereira, Dr. Juliano Bordignon e Prof. Dr. Mário Steindel.

Aos alunos e professores do Laboratório de Protozoologia, Laboratório de Virologia Aplicada, Laboratório de Imunofarmacologia e Doenças Infecciosas e Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura agradeço pela disposição em ajudar, pela solicitude e agradável convivência ao longo desses anos.

Agradeço a todos os pesquisadores que contribuíram na elaboração dos artigos publicados: à Dra. Alitiane M. L. Pereira pela obtenção dos camarões infectados; ao Prof. Dr. Edmundo C. Grisard pelo conhecimento e suporte na expressão de proteínas, bem como à Dra. Patricia H. Stoco e ao Msc. Rafael D. da Rosa pelos ensinamentos nessa área; e ao Prof. Dr. Eduardo Cargnin-Ferreira pelos experimentos nos ensaios de imunohistoquímica. Também sou grata à Prof. Dra. Luciane Perazzolo pela disposição e auxílio nas correções do artigo de revisão.

Em especial gostaria de agradecer a minha querida amiga Mariana (Nana) Borsa, cuja colaboração neste trabalho foi essencial à sua concretização. Boa parte desse estudo teve a participação direta da Nana, que com toda sua competência e inteligência fizeram-nos obter bons resultados. Agradeço, sobretudo, à sua companhia que tornaram os meus dias de trabalho muito mais agradáveis.

Também sou eternamente grata as queridas Sílvia Lanza e Camila Zanluca, que, além da adorável companhia de bancada, estiveram presentes em muitos momentos da minha vida cotidiana. À doce e amável Sílvia sou eternamente grata pelo ombro amigo, pelas risadas e por me proporcionar a vivência de um momento belíssimo: o nascimento da vida. À sorridente e serena Camila, eu agradeço pelas diversas dicas nos experimentos, bem como aos muitos momentos de descontração em viagens, na praia ou em barzinhos.

Ao meu amado Felipe, a minha eterna gratidão e ternura por todo seu companheirismo. Uma pessoa que me conforta e proporciona uma convivência repleta de paz, tranquilidade e amor. Muito obrigada por toda sua dedicação, paciência e carinho.

Um agradecimento especial concedo à minha família, cujo amor compartilhado me fornece acolhimento e compreensão. Todo carinho, afeto e harmonia que existe entre nós contribuem - e muito - para hoje eu me considerar uma pessoa verdadeiramente feliz e, por isso, sou profundamente grata. Muito obrigada pelo suporte, incentivo e dedicação!

A Deus sou grata à sua sublimidade ao iluminar os meus caminhos, proporcionando-me uma vida repleta de felicidade e realização.

***A todos que direta ou indiretamente estão presentes em minha vida e que contribuem para que ela seja repleta de realizações e alegria, a minha sincera e carinhosa gratidão. Muito obrigada!***



## RESUMO

O vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) causa uma doença progressiva em camarões de cultivo com substanciais perdas econômicas no Brasil e na Indonésia. Métodos imunológicos simples e rápidos para a detecção do IMNV ainda não são disponíveis devido à falta de anticorpos monoclonais (AcMo) contra o vírus. Neste trabalho, dois fragmentos do gene da proteína do capsídeo do IMNV, abrangendo os aminoácidos 105-297 (IMNV<sub>105-297</sub>) e 300-527 (IMNV<sub>300-527</sub>), foram clonados e expressos em *Escherichia coli*. Ambas sequências nucleotídicas e aminoácídicas deduzidas de IMNV<sub>105-297</sub> e IMNV<sub>300-527</sub> apresentaram elevada identidade com sequências de IMNV isolados no Brasil (99%) e na Indonésia (98%). Dentre os hibridomas que foram obtidos, seis AcMo anti-rIMNV<sub>105-297</sub> (1.1D, 1.3H, 3.3G, 3.9G, 4.6C, 5.4H) e dez AcMo anti-rIMNV<sub>300-527</sub> (1.3G, 1.3H, 1.8C, 2.9C, 2.9E, 3.3A, 9.7F, 9.8D, 9.8H, 11.2D) foram selecionados para se avaliar suas reatividades contra a proteína do capsídeo viral presente em lisado de camarões infectados por IMNV. Nos ensaios de imunodot-blot, cinco AcMo anti-rIMNV<sub>105-297</sub> e oito AcMo anti-rIMNV<sub>300-527</sub> apresentaram distintas sensibilidades contra lisados de tecido muscular infectado por IMNV, bem como contra rIMNV<sub>105-297</sub> ou rIMNV<sub>300-527</sub>. Dentre esses, três AcMo anti-rIMNV<sub>105-297</sub> (1.3H, 4.6C, 5.4H) e cinco AcMo anti-rIMNV<sub>300-527</sub> (1.3H, 1.8C, 2.9E, 3.3A, 11.2D) demonstraram alta especificidade contra a proteína nativa do IMNV nos ensaios de Western-blot, visto que reconheceram somente uma proteína de 100 kDa - massa esperada para a proteína do capsídeo do IMNV. Nas imunohistoquímicas, dois AcMo anti-rIMNV<sub>105-297</sub> (1.3H, 4.6C) e quatro AcMo anti-rIMNV<sub>300-527</sub> (1.8C, 2.9E, 3.3A, 11.2D) ligaram-se a inclusões virais presentes em fibrose muscular e em áreas de necrose coagulativa. Concluindo, esses seis AcMo foram sensíveis e específicos em todos os imunoenaios realizados e poderão ser utilizados em testes de imunodiagnóstico de rotina para prevenção e controle da disseminação do IMNV.

**Palavras-chave:** Vírus da mionecrose infecciosa (IMNV), proteína recombinante, anticorpos monoclonais, imunoenaios, camarões penéideos.





## ABSTRACT

Infectious myonecrosis virus (IMNV) has been causing a progressive disease in farm-reared shrimp with substantial economical losses in northeastern Brazil and Indonesia. Simple and rapid immunological methods for IMNV detection are not yet available due to the lack of monoclonal antibodies (MAbs) against the virus. In this report, two fragments of the IMNV major capsid protein gene, comprising amino acids 105-297 (IMNV<sub>105-297</sub>) and 300-527 (IMNV<sub>300-527</sub>), were cloned and expressed in *Escherichia coli*. Both nucleotide and deduced amino acid sequences of IMNV<sub>105-297</sub> and IMNV<sub>300-527</sub> displayed high identity to IMNV isolated from Brazil (99%) and Indonesia (98%). Among several clones secreting antibodies against the IMNV recombinant proteins, six MAbs anti-rIMNV<sub>105-297</sub> (1.1D, 1.3H, 3.3G, 3.9G, 4.6C, 5.4H) and ten MAbs anti-rIMNV<sub>300-527</sub> (1.3G, 1.3H, 1.8C, 2.9C, 2.9E, 3.3A, 9.7F, 9.8D, 9.8H, 11.2D) were selected to evaluate their reactivity against the native IMNV capsid protein from IMNV-infected shrimp. In immunodot-blot, five MAbs anti-rIMNV<sub>105-297</sub> and eight MAbs anti-rIMNV<sub>300-527</sub> presented distinct levels of sensitivities against IMNV-infected muscle tissue homogenate and against rIMNV<sub>105-297</sub> or rIMNV<sub>300-527</sub>. From those, three MAbs anti-IMNV<sub>105-297</sub> (1.3H, 4.6C, 5.4H) and five MAbs anti-IMNV<sub>300-527</sub> (1.3H, 1.8C, 2.9E, 3.3A, 11.2D) demonstrated high specificity against the native IMNV protein in Western-blot, since they only recognized a 100 kDa protein - the predicted mass of IMNV capsid protein. In immunohistochemistry, two MAbs anti-rIMNV<sub>105-297</sub> (1.3H, 4.6C) and four MAbs anti-rIMNV<sub>300-527</sub> (1.8C, 2.9E, 3.3A, 11.2D) bound to viral inclusions present in muscle fibrosis and coagulative necrosis areas. In conclusion, these six MAbs were sensitive and specific in all immunoassays performed herein, and can be used in routine immunodiagnostic tests to prevent and control IMNV dissemination.

**Keywords:** Infectious myonecrosis virus (IMNV), recombinant protein, monoclonal antibodies, immunoassays, penaeid shrimp.



## LISTA DE FIGURAS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figura 1.</b> Desempenho da carcinicultura brasileira entre 1996 e 2007 .....  | <b>03</b> |
| <b>Figura 2.</b> Sinais clínicos da enfermidade causada por IMNV em camarões <i>L. vannamei</i> .....   | <b>05</b> |
| <b>Figura 3.</b> Morfologia, perfil proteico e estrutura genômica do IMNV .....   | <b>08</b> |
| <b>Figura 4.</b> Esquema do genoma do IMNV e dos fragmentos rIMNV <sub>105-297</sub> e rIMNV <sub>300-527</sub> .....   | <b>39</b> |
| <b>Figura 5.</b> Produtos de amplificação obtidos por RT-PCR utilizando iniciadores específicos para dois fragmentos do gene da proteína do capsídeo do IMNV..... | <b>40</b> |
| <b>Figura 6.</b> Alinhamento múltiplo da sequência nucleotídica de IMNV <sub>105-297</sub> com sequências homólogas da proteína do capsídeo de IMNV.....          | <b>43</b> |
| <b>Figura 7.</b> Alinhamento múltiplo da sequência nucleotídica de IMNV <sub>300-527</sub> com sequências homólogas da proteína do capsídeo de IMNV.....          | <b>44</b> |
| <b>Figura 8.</b> Alinhamento múltiplo da sequência aminoacídica deduzida de IMNV <sub>105-297</sub> com sequências homólogas da proteína do capsídeo de IMNV..... | <b>48</b> |
| <b>Figura 9.</b> Alinhamento múltiplo da sequência aminoacídica deduzida de IMNV <sub>300-527</sub> com sequências homólogas da proteína do capsídeo de IMNV..... | <b>49</b> |
| <b>Figura 10.</b> Produtos da digestão de vetores de clonagem contendo IMNV <sub>105-297</sub> ou IMNV <sub>300-527</sub> .....                                   | <b>50</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Figura 11.</b> Produtos de amplificação obtidos por PCR de colônias <i>E. coli</i> BL21 (DE3) transformadas com pET-IMNV <sub>105-297</sub> ou pET-IMNV <sub>300-527</sub> .....   | <b>52</b> |
| <b>Figura 12.</b> Padrões de expressão proteica de rIMNV <sub>105-297</sub> e rIMNV <sub>300-527</sub> sob diferentes condições de temperatura e tempos de cultivo.....               | <b>55</b> |
| <b>Figura 13.</b> Avaliação da solubilidade das proteínas recombinantes rIMNV <sub>105-297</sub> e rIMNV <sub>300-527</sub> expressas em sistema procariótico.....                    | <b>57</b> |
| <b>Figura 14.</b> Padrão de purificação de rIMNV <sub>105-297</sub> e rIMNV <sub>300-527</sub> por coluna de afinidade contendo níquel .....  | <b>59</b> |
| <b>Figura 15.</b> Avaliação da expressão e purificação de rIMNV <sub>105-297</sub> e rIMNV <sub>300-527</sub> por Western-blot .....  | <b>60</b> |
| <b>Figura 16.</b> Titulação dos anticorpos séricos de camundongos imunizados com rIMNV <sub>105-297</sub> ou rIMNV <sub>300-527</sub> por ELISA indireto.....                         | <b>62</b> |
| <b>Figura 17.</b> Detecção por Western-blot da proteína nativa do capsídeo de IMNV utilizando-se AcMo anti-IMNV.....  | <b>73</b> |
| <b>Figura 18.</b> Histopatologia de tecido muscular esquelético de camarões infectados com IMNV e perfil de reatividade dos AcMo positivos contra o vírus por imunohistoquímica ..... | <b>76</b> |
| <b>Figura 19.</b> Panorama de reatividade dos AcMo anti-rIMNV <sub>105-297</sub> e anti-rIMNV <sub>300-527</sub> contra tecidos infectados ou não com IMNV por imunohistoquímica..... | <b>79</b> |

## LISTA DE QUADROS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Quadro 1.</b> Sequências dos iniciadores utilizados para amplificar o gene da actina e dois fragmentos gênicos da proteína do capsídeo do IMNV que contemplam os aminoácidos 105-297 (IMNV <sub>105-297</sub> ) e 300-527 (IMNV <sub>300-527</sub> ) ..... | <b>21</b> |
|---|-----------|

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Quadro 2.</b> Parâmetros bioquímicos deduzidos dos fragmentos protéicos rIMNV <sub>105-297</sub> e rIMNV <sub>300-527</sub> ..... | <b>53</b> |
|--|-----------|

## LISTA DE TABELAS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Tabela 1.</b> Relação de hibridomas obtidos nas fusões de mielomas com esplenócitos provenientes de camundongos imunizados com IMNV <sub>105-297</sub> ou IMNV <sub>300-527</sub> ..... | <b>63</b> |
|--|-----------|

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Tabela 2.</b> Isotipos dos anticorpos monoclonais contra rIMNV <sub>105-297</sub> e rIMNV <sub>300-527</sub> e avaliação da reatividade frente tecido de camarão infectado por IMNV ..... | <b>68</b> |
|--|-----------|



## LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS – Ácido 2,2'-azino-bis-(3-etil-benzotiazolna-6- ácido sulfônico)

AcMo – Anticorpo(s) monoclonal(is)

ATCC – Coleção americana de tipos de cultura (*American Type Culture Collection*)

BLAST - Ferramenta local básica da busca do alinhamento  
(*Basic local alignment search tool*)

BSA – Albumina de soro bovino

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar

CEUA - Comitê de Ética de Uso de Animais

DMSO – Dimetilsulfóxido

DEPC – Dietilpirocarbonato

dfRNA – RNA dupla fita

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DO – Densidade óptica

dNTP – Deoxinucleotídeos trifosfatados

EDTA – Ácido etilenodiaminotetraacético

ELISA – Ensaio de imunoabsorção ligado à enzima  
(*Enzyme linked immunossorbert assay*)

FAO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*)

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

g – Grama(s)

h – Hora(s)

ha – Hectare(s)

HAT – Hipoxantina, Aminopterina, Timidina

Hz – Hertz

HT – Hipoxantina, Timidina

IHHNV - Vírus da infecção na hipoderme e necrose do tecido  
hematopoético (*Infectious hypodermal and  
hematopoietic necrosis virus*)

Ig – Imunoglobulina(s)

IMNV – Vírus da mionecrose infecciosa  
(*Infectious myonecrosis virus*)

IPTG – Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo

kDa – Kilodalton

kg – Kilograma

kV – Kilovolt

LB – Meio Luria-Bertani

l – Litro(s)

LAMP – Amplificação circular isotérmica  
(*loop mediated isothermal amplification*)

LDP – Tira de medição por fluxo lateral (*lateral flow dipstick*)

M – Molar

$\mu$ g – Micrograma(s)

$\mu$ l – Microlitro(s)

$\mu$ M – Micromolar

mA – Miliampéres



mg – Miligrama

min – Minuto(s)

ml – Mililitros

mM – Milimolar

ng – Nanograma(s)

nm – Nanômetros

OIE – Organização mundial de saúde animal

*(World organization of animal health)*

ORF – Janela aberta de leitura *(Open reading frame)*

OPD – Orto-fenileno-diamina

pb – Pares de bases

PBS – Solução tamponada de fosfato

PCR – Reação em cadeia da polimerase

*(Polymerase chain reaction)*

PEG – Polietilenoglicol

pg – Picograma

pH – Potencial hidrogeniônico

pmol – Picomol

PSA – Penicilina, Streptomicina, Anfotericina B

RNA – Ácido ribonucleico

rpm – Rotações por minuto

RPMI – meio *Roswell Park Memorial Institute*

RpRd – RNA polimerase dependente de RNA

RT-PCR – Reação da cadeia da polimerase por transcrição

*reversa (Reverse transcription polymerase chain reaction)*

s – Segundo(s)

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo  
dodecil sulfato de sódio

SFB – Soro fetal bovino

*Taq* – *Thermus aquaticus*

TBE – Tris, borato, EDTA

TIC – Teste imunocromatográfico

ton – Tonelada(s)

TSV – Vírus da síndrome de Taura (*Taura syndrome virus*)

U – Unidade(s)

UV – Ultravioleta

V – Volt

W – Watts

WSSV – Vírus da mancha branca (*White spot syndrome virus*)

xg – Força gravitacional

X-GAL – 5-Bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactosídeo

YHV – Vírus da cabeça amarela (*Yellow head virus*)

°C – Graus Celsius

## SUMÁRIO

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>01</b> |
| <b>1.1. Vírus da mionecrose infecciosa .....</b>   | <b>03</b> |
| <b>1.2. Métodos de diagnóstico para IMNV .....</b>   | <b>09</b> |
| <b>2. OBJETIVOS .....</b>  | <b>17</b> |
| <b>2.1. Objetivo geral .....</b>   | <b>17</b> |
| <b>2.2. Objetivos específicos .....</b>  | <b>17</b> |
| <b>3. METODOLOGIA .....</b>  | <b>19</b> |
| <b>3.1. Animais e considerações éticas .....</b>   | <b>19</b> |
| <b>3.2. Camarões .....</b>   | <b>19</b> |
| <b>3.3. Extração de RNA total e síntese de cDNA .....</b>  | <b>19</b> |
| <b>3.4. Escolha das regiões a serem clonadas e desenho dos iniciadores.....</b>                          | <b>21</b> |
| <b>3.5. Amplificação dos fragmentos IMNV<sub>105-297</sub> e IMNV<sub>300-527</sub> .....</b>            | <b>22</b> |
| <b>3.6. Clonagem e sequenciamento de IMNV<sub>105-297</sub> e IMNV<sub>300-527</sub> .....</b>           | <b>23</b> |
| <b>3.7. Expressão heteróloga e purificação de rIMNV<sub>105-297</sub> e rIMNV<sub>300-527</sub>.....</b> | <b>26</b> |
| <b>3.8. Imunizações de camundongos com rIMNV<sub>105-297</sub> ou rIMNV<sub>300-527</sub>.....</b>       | <b>28</b> |
| <b>3.9. Ensaio de imunoabsorção ligado à enzima .....</b>  | <b>29</b> |
| <b>3.10. Hibridomas .....</b>  | <b>30</b> |
| <b>3.10.1. Obtenção dos esplenócitos .....</b>   | <b>30</b> |

|  |               |
|--|---------------|
| 3.10.2. Células de mieloma .....   | 30            |
| 3.10.3. Produção e manutenção dos hibridomas .....   | 31            |
| 3.10.4. Criopreservação de hibridomas .....  | 32            |
| <b>3.11. Isotipagem .....</b>  | <b>32</b>     |
| <b>3.12. Reatividade dos anticorpos monoclonais frente a tecido de camarão infectado por IMNV .....</b>  | <b>33</b>     |
| 3.12.1. Imunodot-blot e Western-blot .....   | 33            |
| 3.12.2. Imunohistoquímica .....  | 35            |
| <br><b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>   | <br><b>37</b> |
| <b>4.1. Amplificação, clonagem e sequenciamento de IMNV<sub>105-297</sub> e IMNV<sub>300-527</sub> .....</b>   | <b>37</b>     |
| <b>4.2. Expressão e caracterização de rIMNV<sub>105-297</sub> e rIMNV<sub>300-527</sub> .....</b>  | <b>50</b>     |
| <b>4.3. Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra rIMNV<sub>105-297</sub> e rIMNV<sub>300-527</sub> .....</b>                         | <b>60</b>     |
| <b>4.4. Detecção de IMNV por AcMo anti-rIMNV<sub>105-297</sub> e anti-rIMNV<sub>300-527</sub> em tecidos de camarões naturalmente infectados .....</b> | <b>69</b>     |
| <br><b>SUMÁRIO DE RESULTADOS .....</b>   | <br><b>83</b> |
| <b>CONCLUSÃO .....</b>   | <b>85</b>     |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>  | <b>87</b>     |

## 1. INTRODUÇÃO

Paulatinamente, pescadores deixam a pesca extrativista e passam a investir em produtos qualitativa e quantitativamente mais rentáveis. A aquíicultura, que consiste no cultivo de organismos aquáticos como peixes, crustáceos, moluscos e plantas aquáticas, passou a ser uma alternativa bastante promissora, posto que através dela vem atingindo-se uma maior escala de produção, além de proteger o ambiente natural do extrativismo excessivo.

A aquíicultura é um dos setores de produção de alimentos que mais cresceu ao longo dos últimos 50 anos no mundo, cuja produção de um milhão de toneladas do início da década de 50 elevou-se para 51,7 milhões de toneladas em 2006 (FAO, 2009). Um dos setores da aquíicultura que contribui significativamente para tal desenvolvimento é a carcinicultura, que consiste no cultivo de crustáceos em cativeiro. Mundialmente, a carcinicultura cresceu 165% no período entre 1997 e 2004, representando uma expansão anual de 15% (FAO, 2006). Em 2006, a produção de camarões superou 4,5 milhões de toneladas (US\$17,95 bilhões), sendo que 88% da produção mundial provêm da Ásia, principalmente de países como China, Tailândia, Vietnã, Indonésia e Índia. Dentre os países da América Latina, Equador, México e Brasil sobressaem-se na produção desse crustáceo (FAO, 2006, 2009).

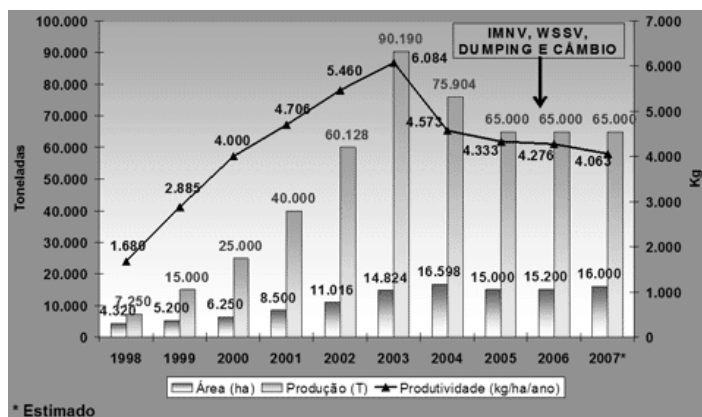
No Brasil, as tentativas de implementação do cultivo de camarões iniciaram-se na década de 70. No princípio, cultivaram-se as espécies nativa *Farfantepenaeus brasiliensis* e exótica *Marsupenaeus japonicus* (NUNES; SURESH, 2001). Contudo, experiências com essas espécies de camarões levaram a resultados insatisfatórios, visto que não se alcançou as condições adequadas para o cultivo desses animais. Assim, na década de 80, visando reverter essa situação, com o auxílio de empresas privadas, órgãos públicos de fomento

e Universidades, passou-se a cultivar a espécie exótica do Pacífico ocidental *Litopenaeus vannamei*, devido às suas características de alta produtividade, rápido crescimento, sobrevivência e adaptação a variadas condições de cultivo (NUNES; SURESH, 2001). Todavia, somente a partir do início dos anos 90, após a aplicação de avanços tecnológicos nas fazendas de cultivo de camarões, foi que se demonstrou a superioridade dessa espécie em relação às espécies nativas (ROCHA, 2007), sendo a principal espécie de camarão empregada na carcinicultura brasileira e mundial.

Dados demonstram que a carcinicultura brasileira apresentou crescimento anual de 70% entre 1996 e 2000, elevando sua produção de 2.880 para 25.000 toneladas, sendo que a região Nordeste do país apresenta os melhores índices de produção, especialmente nos estados do Rio Grande do Norte, Ceará e Pernambuco (PEREIRA; MENDES; GESTEIRA, 2008). Esse crescimento exponencial também pode ser evidenciado nos anos subsequentes, atingindo o ápice em 2003 com a produção de 90.190 toneladas (Figura 1). Contudo, apesar do cultivo de animais aquáticos ser uma atividade bem estabelecida e com elevada lucratividade, a carcinicultura brasileira, assim como no âmbito mundial, enfrenta limitações ao seu desenvolvimento. Em 2004, com o advento da ação *antidumping* imposta pelos Estados Unidos, associado a fatores como a desvalorização do dólar e a rápida disseminação de doenças, a carcinicultura brasileira perdeu competitividade nas exportações (Figura 1) (ROCHA, 2007). As principais enfermidades que acometem camarões são causadas principalmente por micro-organismos patogênicos, tais como bactérias, protozoários, fungo e vírus (OIE, 2009; LIGHTNER; REDMAN, 1998; LIGHTNER, 2011).

Os vírus são considerados os patógenos de maior importância na carcinicultura, uma vez que provocam elevada mortalidade no cultivo (LIGHTNER, 2003;

BONAMI, 2008; LIGHTNER, 2011). No Brasil, epidemias de etiologia viral têm sido responsáveis por expressivas quedas na produção de camarões desde 2004, principalmente devido à ocorrência de infecções pelo vírus da síndrome da mancha branca (WSSV - *White spot syndrome virus*) na região Sul e pelo vírus da mionecrose infecciosa (IMNV - *Infectious myonecrosis virus*) na região Nordeste do país (Figura 1) (SEIFFERT et al., 2006; ABCC, 2007).



**Figura 1.** Desempenho da carcinicultura brasileira entre 1996 e 2007 (ABCC, 2007).

### 1.1. Vírus da mionecrose infecciosa

O IMNV foi primeiramente identificado no estado do Piauí em 2002 (NUNES; MARTINS; GESTEIRA, 2004). Entretanto, ao longo dos anos subsequentes, esse vírus dispersou-se rapidamente para os demais estados da

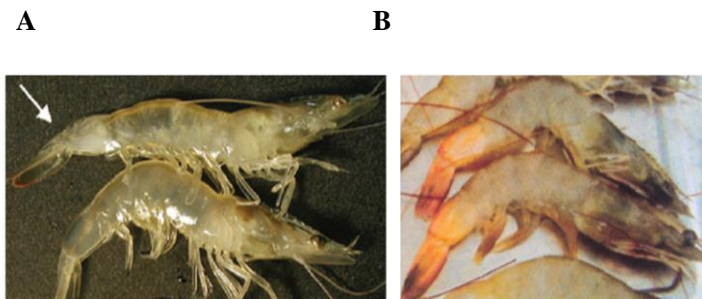
região Nordeste do Brasil (ANDRADE et al., 2007; PINHEIROS et al., 2007; SILVA et al., 2010). Surtos de infecção por esse patógeno já foram relatados em fazendas nas Ilhas de Java e Sumatra da Indonésia, no sudeste da Ásia (SENAPIN et al., 2007; OIE, 2009); casos suspeitos a serem confirmados foram reportados na Ilha de Hainan, China e sudoeste da Tailândia (OIE, 2009).

As perdas atreladas à morte de camarões de cultivo infectados por IMNV somam percentuais elevados ao longo do processo produtivo. O desenvolvimento da doença ocorre predominantemente em animais de peso entre 6 e 10 gramas, onde a mortalidade inicial pode chegar a 10%, seguido de uma fase aguda que se caracteriza por perdas de 40 a 80% dos animais cultivados. Posteriormente, uma fase crônica é identificada, sendo a mortalidade moderada e persistente (COVARRUBIAS, 2010). De acordo com os dados da Associação Brasileira de Criadores de Camarões (ABCC), estima-se que as perdas econômicas devido a infecções por IMNV somaram US\$ 100-200 milhões entre 2004 e 2006 (LIGHTNER, 2011).

A infecção causada por IMNV foi primeiramente relatada em camarões da espécie *L. vannamei*; contudo, verificou-se que *L. stylirostris*, *Penaeus monodon* e *F. subtilis* também são susceptíveis à infecção (TANG et al., 2005; COELHO et al., 2009). Os sinais clínicos característicos atribuídos pela infecção por IMNV são necrose dos músculos estriados do abdômen e do cefalotórax. Os segmentos abdominais apresentam opacidade focal ou multifocal que progride do último segmento para o restante do corpo do animal e, em estágios mais avançados da doença, músculos e apêndices podem exibir coloração avermelhada (Figura 2) (NUNES; MARTINS; GESTEIRA, 2004; LIGHTNER et al., 2004; POULOS et al., 2006). Associado a esses sintomas, os peneídeos enfermos podem apresentar redução de consumo alimentar, repercutindo em anorexia, diminuição



do volume do hepatopâncreas, redução de lipídeos, nado desorientado e dificuldade de endurecimento da carapaça (NUNES; MARTINS; GESTEIRA, 2004).



**Figura 2.** Sinais clínicos da enfermidade causada por IMNV em camarões *L. vannamei*. **(A)** O camarão acima demonstra sinais iniciais de mionecrose muscular evidenciada por opacidade do último segmento abdominal (flecha); abaixo se encontra um camarão sadio com tecido muscular translúcido devido à ausência de mionecrose (adaptado de POULOS et al., 2006). **(B)** Estágio avançado da mionecrose com a presença de pigmentação avermelhada nos últimos segmentos abdominais (adaptado de PEREIRA; MENDES; GESTEIRA, 2008).

Histologicamente, a mionecrose causada pelo IMNV é caracterizada por fibrose muscular, edema e infiltração hemocítica (TANG et al., 2005; POULOS et al., 2006; COVARRUBIAS, 2010). Inclusões virais basofílicas são visualizadas no citoplasma de células musculares infectadas. Nos estágios avançados de danos teciduais, desenvolve-se uma necrose coagulativa, que se caracteriza pela acentuada ruptura celular que pode acarretar numa substituição da musculatura por tecido conjuntivo. Os espécimes infectados por IMNV ainda

apresentam hipertrofia de órgãos linfóides e formação de esferóides ectópicos. Além do tecido muscular esquelético, o IMNV pode infectar diferentes tecidos e órgãos, tais como órgãos linfóides, brânquias, intestino, hepatopâncreas, coração, células de tecido conjuntivo e hemócitos (TANG et al., 2005; POULOS et al., 2006; KUNANOPPARAT et al., 2011).

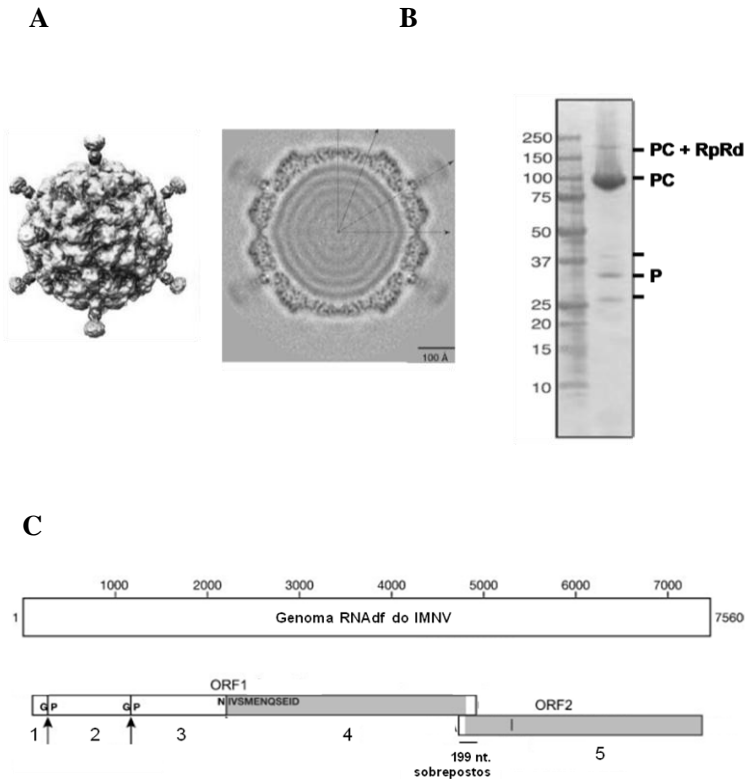
A partir da purificação da partícula viral, identificou-se que o IMNV é um vírus icosaédrico, não envelopado, com 40 nm de diâmetro (POULOS et al., 2006). O capsídeo apresenta 120 subunidades formadas por uma proteína estrutural majoritária de 99 kDa e pela presença de protruções (Figura 3A e B), algo inédito na família Totiviridae (TANG et al., 2008). Essas protruções são de natureza protéica e podem estar envolvidas no processo de adsorção e penetração nas células-alvo.

A estrutura tridimensional deduzida do IMNV demonstra que o genoma é compactado de forma helicoidal no interior do capsídeo (Figura 3A) (TANG et al., 2008). O genoma é formado por um único segmento de RNA dupla fita contendo 7.560 pares de bases e apresenta duas janelas abertas de leitura (ORF) (POULOS et al., 2006).

A ORF 5' (ORF-1) localiza-se entre os nucleotídeos 136 e 4.953 - apresentando um total de 4.818 nucleotídeos - e é provavelmente traduzida na forma de uma poliproteína. Essa poliproteína é subsequentemente clivada em três fragmentos de 93, 284 e 1.228 aminoácidos (Figura 3C). O fragmento contendo 93 aminoácidos (10 kDa) apresenta presuntiva função de ser uma proteína de ligação ao RNA dupla fita, estando possivelmente envolvido na regulação da replicação viral ou do sistema imune do hospedeiro. O fragmento de 1.228 aminoácidos é novamente clivado, gerando fragmentos proteicos de 327 e 901 aminoácidos. O fragmento de 901 aminoácidos (99 kDa) corresponde a proteína do capsídeo do IMNV que é

majoritariamente encontrada no perfil proteico do vírus purificado (Figura 3B). Entretanto, as possíveis funções dos fragmentos de 284 (32 kDa) e 327 (38 kDa) aminoácidos gerados após as clivagens da poliproteína ainda são desconhecidas, mas podem referir-se às proteínas de pequeno peso molecular visualizadas em SDS-PAGE e apresentam presuntiva função na formação das protusões (Figura 3A e B). A ORF 3' (ORF-2) localiza-se entre os nucleotídeos 5.241 e 7.451 - apresentando um total de 2.221 nucleotídeos - e codifica uma RNA polimerase dependente de RNA (RpRd) de 736 aminoácidos (85 kDa) (POULOS et al., 2006; NIBERT, 2007; TANG et al., 2008).

Primeiramente, foi identificado que as duas ORF do genoma do IMNV não se sobrepunham, havendo 287 nucleotídeos separando as mesmas (POULOS et al., 2006). Porém, a posterior análise da posição do códon de terminação da ORF-1 identificou que esse não se encontrava na janela de leitura correta, localizando-se verdadeiramente após o início da ORF-2. Assim, concluiu-se que ORF-1 e ORF-2 se sobrepõem em 199 nucleotídeos (Figura 3C). Além disso, há discordâncias quanto ao início da segunda fase de leitura, pois domínios que indicam uma possível ocorrência de mudança da fase de leitura pelo ribossomo estão presentes antes do proposto início da ORF-2, proporcionando uma sobreposição das duas ORF. Devido a essa sobreposição, ORF-1 e ORF-2 seriam traduzidas conjuntamente, gerando uma proteína de 1.734 aminoácidos (196 kDa) (Figura 3B), que seria posteriormente clivada e estaria presente em poucas cópias na partícula viral (NIBERT, 2007).



**Figura 3.** Morfologia, perfil proteico e estrutura genômica do IMNV. **(A)** Reconstrução tridimensional do IMNV revelando sua estrutura icosaédrica com protrusões e genoma concentricamente distribuído. **(B)** Perfil proteico de vírus purificados em SDS-PAGE. PC+RpRd= proteína do capsídeo fusionada com a RNA polimerase dependente de RNA com ~ 196 kDa; PC= proteína do capsídeo de ~ 100 kDa; P= fragmentos possivelmente correspondentes às protrusões presentes no capsídeo (adaptado de TANG et al., 2008). **(C)** Estrutura do genoma do IMNV que apresenta duas janelas abertas de leitura (ORF-1 e ORF-2) sobrepostas em 199 nucleotídeos, cuja ORF-1 codifica os fragmentos proteicos 1-4 e a ORF-2 codifica a proteína 5. 1= proteína de ligação ao RNA dupla fita (10 kDa); 2 e 3= fragmentos com função desconhecida que estão identificados com P no perfil proteico (32 e 38 kDa, respectivamente) ; 4= PC; 5= RpRd (adaptado de NIBERT, 2007).

## 1.2. Métodos de diagnóstico para IMNV

Dentre as inúmeras áreas de pesquisas envolvendo viroses que acometem camarões, o desenvolvimento de métodos de diagnóstico é um dos que apresenta maior carência, apesar de sua grande relevância. Diagnosticar precocemente camarões infectados por vírus é essencial para que medidas de contenção possam ser realizadas, a fim de minimizar os danos causados pela dispersão do patógeno. Assim, o diagnóstico rápido e específico de vírus é uma das estratégias mais válidas para que se acionem medidas que reduzam perdas no cultivo, uma vez que não há tratamento disponível para viroses de camarão.

Diversos métodos de diagnóstico têm sido utilizados a fim de identificar animais infectados, bem como selecionar os animais livres do patógeno e resistentes aos mesmos. Primeiramente, os diagnósticos disponíveis para a detecção do IMNV baseavam-se na observação dos sinais clínicos ou análises de cortes histológicos de animais infectados (NUNES; MARTINS; GESTEIRA, 2004; LIGHTNER et al., 2004). Contudo, demais patógenos, tais como *P. vannamei nodavirus* (PvNv) (TANG et al., 2007) e *Vibrio* spp. (LONGYANT et al., 2008a), bem como fatores físico-químicos como hipóxia e variações na temperatura e salinidade, podem acarretar no esbranquiçamento da musculatura do camarão, que é o principal sinal clínico observado em animais infectados por IMNV. Portanto, essas metodologias são pouco específicas e não são recomendadas como ferramentas para diagnósticos precisos.

Ademais, análises de parâmetros imunológicos – por exemplo, número de hemócitos circulantes na hemolinfa, tempo de aglutinação, atividade microbiana, produção de superóxido e atividade da enzima fenoloxidase – são usualmente utilizados para prever as condições de salubridade dos animais de cultivo (SONG et al., 2003; YEH et al., 2009). Entretanto, esse tipo de

método presuntivo não é válido para monitoramento de camarões acometidos por IMNV. Costa e colaboradores (2009) relatam que mudanças significativas nos parâmetros imunológicos são identificadas apenas em estágio avançados da doença, sugerindo que o sistema imune dos camarões infectados responde apenas nessa fase da doença, não sendo, portanto, útil para o controle das epidemias acarretadas por esse vírus.

Assim, desenvolveram-se metodologias que promovam diagnósticos com maior especificidade e sensibilidade e que confirmem resultados mais confiáveis, especialmente técnicas que utilizam ferramentas da biologia molecular ou imunológicas. Tang e colaboradores (2005) desenvolveram o primeiro método de diagnóstico que não se baseava apenas nos sintomas clínicos ou histopatológicos. Esses desenvolveram uma sonda capaz de reconhecer o genoma do IMNV em tecidos infectados pela técnica de hibridização *in situ*. Andrade e colaboradores (2008) testaram as condições de fixação de tecidos de camarão que são requeridas para a realização dessa técnica, verificando que mesmo após dez dias consecutivos de fixação com fixador de Davidson - fixador mais comumente utilizado para a fixação de tecidos de camarão - o genoma do IMNV não sofre degradação (ANDRADE; REDMAN; LIGHTNER, 2008). Resultados contraditórios a esse foram encontrados para o TSV, haja vista que seu genoma sofre degradação devido ao pH acidificado desse fixador, resultando em falsa negatividade (HASSON et al., 1997). Acredita-se que essa diferença na susceptibilidade a baixos pH seja devido à natureza do genoma do IMNV, RNA dupla fita, tornando-o mais estável que outros vírus RNA simples fita, tal como o TSV (ANDRADE; REDMAN; LIGHTNER, 2008).

Outras técnicas moleculares já foram desenvolvidas a fim de se obter diagnósticos mais precisos e precoces de surtos de infecção por IMNV, tais como a reação da polimerase em cadeia por transcrição reversa

(RT-PCR) (POULOS; LIGHTNER, 2006), *nested* RT-PCR (SENAPIN et al., 2007) e PCR em tempo real (ANDRADE et al., 2007). Entretanto, embora essas técnicas sejam bastante específicas e sensíveis, elas possuem desvantagens quanto à onerosidade, tempo para obtenção dos resultados, elevado risco de contaminações e requerimento de pessoas bem treinadas e de uma estrutura física adequada.

Em 2009, Puthawibool e colaboradores padronizaram uma metodologia de diagnóstico molecular que permitiu a amplificação da RpRd do IMNV em temperatura constante, técnica conhecida como LAMP (*loop mediated isothermal amplification*). LAMP permite a amplificação de sequências nucleotídicas com alta especificidade sem a necessidade de se usar termocicladores e longos ciclos de variação de temperatura. Associada a essa técnica, esses mesmos autores otimizaram a visualização dos resultados através da técnica LDP (*lateral flow dipstick*), que consiste em um método cromatográfico de revelação em membranas. Para tanto, hibridizaram-se os produtos de amplificação com sondas conjugadas com biotina e FITC, sendo essas posteriormente detectadas por anticorpos específicos imobilizados em membranas (PUTHAWIBOOL et al., 2009). Concomitantemente, Andrade e Lightner (2009) também desenvolveram uma técnica semelhante para a detecção viral através da amplificação de fragmentos gênicos da proteína do capsídeo do IMNV. Esse teste demonstrou sensibilidade 100 vezes maior que RT-PCR, mas foi 10 e 100 vezes menos sensível que *nested* RT-PCR e PCR em tempo real, respectivamente (ANDRADE; LIGHTNER, 2009).

Além das diversas técnicas moleculares disponíveis, imunoensaios também são amplamente empregados para detecção de vírus em camarões de cultivo. Todavia, técnicas imunológicas para o diagnóstico do IMNV eram inexistentes devido à ausência de

anticorpos específicos contra esse vírus. Imunoensaios são usualmente utilizados no diagnóstico de inúmeras doenças virais em aplicações na saúde humana e animal. A grande vantagem de alguns testes imunológicos em relação a técnicas moleculares ou histológicas é a sua simplicidade metodológica, além de apresentarem características como especificidade, sensibilidade e baixo custo. Nessa perspectiva, duas alternativas são possíveis: o uso de soros policlonais ou anticorpos monoclonais (AcMo). Anticorpos policlonais obtidos a partir de soro de animal imunizado com o antígeno de interesse possuem a desvantagem de frequentemente apresentar ligação inespecífica, haja vista que possuem anticorpos contra diversos antígenos e, portanto, podem conferir resultados falso-positivos em imunoensaios (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2002). Em contrapartida, os AcMo são altamente específicos contra um único antígeno, visto que reconhecem apenas epítomos específicos (HOWARD; MATHEW, 2007).

Antigamente, as dificuldades na obtenção de AcMo baseavam-se em limitações na obtenção de células secretoras dessas moléculas, visto que AcMo eram obtidos somente de tumores de linfócitos B. Ademais, essas células tumorais secretam anticorpos com especificidade aleatória, dificultando a obtenção de anticorpos contra o antígeno de interesse (WU; KABAT, 1970). Assim, era preciso criar uma metodologia que possibilitasse a obtenção de células tumorais secretoras de anticorpos com a especificidade requerida. Esse objetivo foi alcançado em 1975, quando Georges Köhler e César Milstein desenvolveram uma metodologia que possibilitou a propagação de linfócitos B *in vitro* e a produção de AcMo em alta escala (KÖHLER; MILSTEIN, 1975). A técnica baseia-se na produção dos anticorpos por linhagens celulares denominadas hibridomas, oriundas da fusão entre células de mieloma - também chamadas de plasmocitomas - e linfócitos B provenientes de baço de animal imunizado,



proporcionando um cultivo ilimitado de células produtoras de anticorpos.

Desde a publicação do método de propagação *in vitro* de linfócitos B em 1975, AcMo têm sido abundantemente empregados como ferramentas para a caracterização e detecção de inúmeras moléculas. AcMo contra os principais vírus que acometem camarões peneídeos são abundantemente encontrados na literatura, sendo os AcMo contra WSSV os mais comumente relatados (POULOS et al., 2001; ANIL et al., 2002; LIU et al., 2002; CHAVISUTHANGKURA et al., 2004, 2010b). Entretanto, o desenvolvimento de AcMo contra IHHNV, TSV e YHV também já foi descrito (POULOS et al., 1994; SITHIGORNGUL et al., 2000; ERICKSON; ZARAINHERZBERG; LIGHTNER, 2002; LONGYANT et al., 2008b; SITHIGORNGUL et al., 2009; CHAVISUTHANGKURA et al., 2010 a). Dentre esses estudos, diversos imunoenaios para detecção viral foram utilizados, tais como ELISA, imunodot-blot, Western-blot e imunohistoquímica.

Um dos imunoenaios mais requeridos na carcinicultura são os testes imunocromatográficos (TIC). Esses são métodos de diagnóstico rápidos, fáceis de serem realizados e interpretados, além de apresentarem baixos custos (PAEK et al., 2000). TIC podem ser utilizados diretamente nas fazendas de camarão, o que evita o tempo despendido no envio de amostras aos laboratórios ou a necessidade de pessoas especializadas para sua realização. Na carcinicultura, os TIC são considerados uma importante medida de biossegurança, haja vista que um diagnóstico preciso e rápido permite medidas profiláticas à disseminação da doença. Ao ser incluído na rotina da fazenda, torna-se uma ferramenta importante de diagnóstico precoce, permitindo uma redução nas perdas de produção e consequente perda financeira.

Até o presente momento, TIC não foram desenvolvidos para a detecção do IMNV em campo.

Contudo, já foram produzidos TIC para a detecção de outras viroses que acometem camarões de cultivo, tais como WSSV e YHV. Sithigorngul e colaboradores (2006) desenvolveram um TIC para a detecção do WSSV com AcMo produzidos contra VP28, uma proteína do envelope viral. No mesmo período, Wang e Zhan (2006) publicaram o desenvolvimento de um segundo TIC contra WSSV. Diferentemente do TIC desenvolvido anteriormente, esse foi desenvolvido utilizando-se AcMo com especificidade contra duas proteínas virais distintas - uma proteína do envelope e outra proteínas do capsídeo viral - a fim de aumentar a sensibilidade de detecção do teste. Ademais, Sithigorngul e colaboradores (2007) desenvolveram um TIC capaz de detectar a presença do YHV em camarões infectados, mostrando-se mais sensível que a técnica de imunodot-blot. Recentemente, desenvolveu-se um TIC para detecção conjunta de YHV e WSSV (SITHIGORNGUL et al., 2011). Para tanto, AcMo contra a proteína do envelope do WSSV (VP28) e a proteína do nucleocapsídeo de YHV (p20) foram utilizados na confecção desse *kit* que apresentou sensibilidade equivalente as identificadas em ensaios de imunodot-blot, mas foi 500 e 1000 vezes menos sensível que PCR para detecção de WSSV e YHV, respectivamente.

Até então, anticorpos contra IMNV não haviam sido desenvolvidos e, por conseguinte, o mercado ainda não fornece os diversos métodos de diagnóstico que utilizam essa ferramenta. Portanto, o presente estudo teve como intuito desenvolver AcMo contra IMNV e utilizá-los em diferentes imunoenaios que possibilitem a detecção do vírus. Para tanto, dois fragmentos do gene da proteína do capsídeo do IMNV, IMNV<sub>105-297</sub> e IMNV<sub>300-527</sub>, foram amplificados, clonados e expressos em *Escherichia coli*. Após imunização de camundongos com as proteínas recombinantes rIMNV<sub>105-297</sub> e rIMNV<sub>300-527</sub>, seus plasmócitos foram imortalizados e selecionados quanto a capacidade de secretar anticorpos contra os fragmentos de

interesse. Posteriormente, avaliaram-se as especificidades e sensibilidades desses AcMo contra o IMNV presente em tecido de camarão infectado pelas técnicas de imunodot-blot, Western-blot e imunohistoquímica, e, assim, identificaram-se os AcMo que poderão ser futuramente utilizados em teste de diagnóstico de rotina.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Produzir e caracterizar anticorpos monoclonais contra dois fragmentos recombinantes da proteína do capsídeo do vírus da mionecrose infecciosa (IMNV) que possam ser utilizados em imunoensaaios para a detecção viral.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Extrair RNA de camarões naturalmente infectados pelo IMNV e realizar a transcrição reversa e amplificação dos fragmentos gênicos IMNV<sub>105-297</sub> e IMNV<sub>300-527</sub>;
- Clonar IMNV<sub>105-297</sub> e IMNV<sub>300-527</sub> nos vetores pGEM T-easy e pET-14b, visando o sequenciamento e a expressão heteróloga desses fragmentos gênicos;
- Comparar as sequências nucleotídicas de IMNV<sub>105-297</sub> e IMNV<sub>300-527</sub>, bem como suas sequências aminoacídicas deduzidas, com o intuito de confirmar suas identidades e similaridades com sequências homólogas presentes em bancos de dados públicos;
- Expressar e purificar os fragmentos proteicos rIMNV<sub>105-297</sub> e rIMNV<sub>300-527</sub>;
- Obter hibridomas secretoras de AcMo contra rIMNV<sub>105-297</sub> e rIMNV<sub>300-527</sub> e caracterizar os isotipos e subtipos dos AcMo obtidos;

- Avaliar a sensibilidade dos AcMo obtidos frente a rIMNV<sub>105-297</sub> ou rIMNV<sub>300-527</sub> e lisados de tecido muscular de camarão infectado por IMNV ou sadio;
- Avaliar a reatividade e a especificidade dos AcMo frente a tecido de camarão infectado por IMNV pelas técnicas de imunodot-blot, Western-blot e imunohistoquímica.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. Animais e considerações éticas**

Este projeto foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (Protocolo PP00203, Processo número 23080.013517/2008-87).

Camundongos machos da espécie *Mus musculus*, linhagem BALB/c, isogênicos, haplótipos H-2K<sup>d</sup>, com idades de 4 a 8 semanas, foram mantidos no biotério setorial do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia/CCB/UFSC, sob padrão sanitário convencional, com água e alimento *ad libitum*.

#### **3.2. Camarões**

Neste trabalho foram utilizados camarões adultos da espécie exótica do Pacífico *L. vannamei* sadios e naturalmente infectados com IMNV. Os espécimes foram obtidos diretamente de carcinicultores da cidade de Parnaíba, no estado do Piauí, Brasil, com o apoio da Dra. Alitiane M. L. Pereira da EMBRAPA Meio-Norte. Os camarões foram escolhidos baseando-se em sinais clínicos brandos de infecção por IMNV, sendo esta confirmada por PCR.

#### **3.3. Extração de RNA total e síntese de cDNA**

Para a extração do RNA total de camarões infectados por IMNV, 1 g de músculo abdominal preservado em RNAlater<sup>TM</sup> (Qiagen) foi dissociada em 1

ml do reagente Trizol (Invitrogen) e incubado por 5 min, conforme instruções atribuídas pelo fabricante. Posteriormente, foram adicionados 200 µl de clorofórmio 98%, sendo as amostras agitadas por 15 seg, seguido de incubação por 3 min e centrifugação a 12.000 x g por 15 min. A fase aquosa foi coletada e adicionou-se 500 µl de isopropanol 98% e após 10 min de incubação as amostras foram centrifugadas por 10 min a 12.000 x g. O precipitado foi lavado com 1 ml de etanol 75% a partir de centrifugação a 7.500 x g por 5 min. Após evaporação total da fase líquida, o precipitado contendo o RNA total foi hidratado em 30 µl de água ultrapura livre de RNase. Após a extração, a concentração e a pureza de RNA nas amostras foram avaliadas por espectrofotometria ( $A_{260/280}$ ) por NanoVue™ (GE-Healthcare), sendo posteriormente congeladas a -20°C.

O DNA complementar (cDNA) foi obtido por transcrição reversa de 1 µg de RNA total previamente extraído de camarão infectado utilizando-se a enzima M-MLV RT e iniciador Oligo(dT)<sub>12-18</sub> (Invitrogen), conforme orientações designadas pelo fabricante. Como controle das etapas de extração de RNA e síntese de cDNA amplificou-se uma sequência gênica de 850 pb, correspondente à proteína intracelular actina, cujas sequências nucleotídicas senso e antisenso dos iniciadores designados a essa sequência gênica estão destacados no Quadro 1 (CADORET et al., 1999). A PCR foi realizada nas seguintes condições: desnaturação inicial a 94°C por 10 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, hibridização dos iniciadores a 55°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min. Ao término dos ciclos, a extensão final foi realizada a 72°C por 10 min. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,0%) e tampão TBE 1X (Tris 890 mM, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 890 mM, EDTA 25 mM, pH 8,0), seguido de incubação do gel em brometo de etídeo (0,01%) para posterior visualização em transluminador Macrovue-UV20 (Hoefer).



**Quadro 1.** Sequências dos iniciadores utilizados para amplificar o gene da actina e dois fragmentos gênicos da proteína do capsídeo do IMNV que contemplam os aminoácidos 105-297 (IMNV<sub>105-297</sub>) e 300-527 (IMNV<sub>300-527</sub>).

| Nomes dos iniciadores               | Sequências 5' – 3'                    |
|-------------------------------------|---------------------------------------|
| Actina- sentido                     | TAATCCACATCTGCTGGAAGGTGG              |
| Actina- antisenso                   | TCACCAACTGGGATGACATGG                 |
| IMNV <sub>105-297</sub> – sentido   | <u>CATATG</u> GGGCAATTACGGTTACAGGG    |
| IMNV <sub>105-297</sub> – antisenso | CGGG <u>ATCC</u> GTATACATACCAAATGGCC  |
| IMNV <sub>300-527</sub> – sentido   | <u>CTCGAG</u> ACTAAACAAACAACAGACAATGC |
| IMNV <sub>300-527</sub> – antisenso | <u>GGATCC</u> GGAGTCCCATCATATAACTGG   |

CATATG: sitio de clivagem da enzima de restrição *NdeI*

GGATCC: sitio de clivagem da enzima de restrição *BamHI*

CTCGAG: sitio de clivagem da enzima de restrição *XhoI*

### 3.4. Escolha das regiões a serem clonadas e desenho dos iniciadores

Duas porções do gene da proteína do capsídeo do IMNV que codificam sequências aminoacídicas pouco hidrofóbicas foram selecionadas com o auxílio do programa ProtScale (disponível em: <<http://www.expasy.ch/tools/protscale.html>>) pelo método de Kyte e Doolittle. A escolha dessas regiões hidrofílicas deve-se a potencial exposição desses epítomos na superfície da partícula viral, facilitando os seus reconhecimentos pelos AcMo em testes de diagnóstico. Ademais, a expressão de proteínas menos hidrofóbicas em sistemas procarióticos facilita o procedimento de purificação, haja vista que se reduz a probabilidade de formação de corpos

de inclusão. A partir da sequência aminoacídica deduzida da proteína viral depositada no *GenBank* (no. acesso AY570982-1), selecionaram-se dois fragmentos que contemplam os aminoácidos das posições 105-297 e 300-527, correspondentes a IMNV<sub>105-297</sub> e IMNV<sub>300-527</sub>, respectivamente.

Os iniciadores senso e antisenso de IMNV<sub>105-297</sub> e IMNV<sub>300-527</sub> foram desenhados utilizando-se o programa Primer3 (disponível em: <<http://frodo.wi.mit.edu/>>) e podem ser visualizados no Quadro 1. Ademais, adicionaram-se sequências correspondentes a sítios clivagem de enzimas de restrição nas extremidades 5' de cada iniciador, visando facilitar a clonagem dos fragmentos. Iniciadores senso e antisenso designados à amplificação de IMNV<sub>105-297</sub> apresentam os sítios de restrição das enzimas *NdeI* e *BamHI*, respectivamente; iniciadores senso e antisenso para IMNV<sub>300-527</sub> apresentam sítios para *XhoI* e *BamHI*, respectivamente. A escolha das enzimas baseou-se na presença dos sítios de clivagem nos vetores de clonagem e expressão utilizados, bem como a ausência dos mesmos nas sequências nucleotídicas dos insertos de interesse.

### **3.5. Amplificação dos fragmentos IMNV<sub>105-297</sub> e IMNV<sub>300-527</sub>**

cDNA sintetizado por transcrição reversa foi então submetido a PCR com os iniciadores desenhados, a fim de amplificar IMNV<sub>105-297</sub> e IMNV<sub>300-527</sub>. A reação ocorreu na presença de 1 U da enzima *Taq* DNA polimerase (LGC Biotecnologia) ou *Platinum*<sup>®</sup> *Taq* DNA polimerase (Invitrogen) e seus respectivos tampões, 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 -1 µl de cDNA e 0,4 µM de cada iniciador em um volume final de 10 µl. Os passos e condições de amplificação de IMNV<sub>105-297</sub> foram:

desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 seg, hibridização dos iniciadores a 60°C por 45 seg e extensão a 72 °C por 45 seg. Ao término dos ciclos, a extensão final foi realizada a 72°C por 10 min. Para amplificação de IMNV<sub>300-527</sub>, realizaram-se os seguintes passos: desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 seg, hibridização dos iniciadores a 55°C por 45 seg e extensão a 72°C por 1 min. Ao término dos ciclos, a extensão final foi realizada a 72°C por 5 min. A visualização dos produtos de amplificação foi feita em gel de agarose (1%) por eletroforese em tampão TBE 1X, incubação com brometo de etídeo (0,01%) e visualização em transluminador.

### **3.6. Clonagem e sequenciamento de IMNV<sub>105-297</sub> e IMNV<sub>300-527</sub>**

IMNV<sub>105-297</sub> e IMNV<sub>300-527</sub> amplificados foram ligados no vetor pGEM T-easy (Promega) utilizando-se a enzima T4 DNA Ligase (Promega), conforme especificações do fabricante. Os vetores pGEM-IMNV<sub>105-297</sub> e pGEM-IMNV<sub>300-527</sub> foram então utilizados na transformação de *E. coli* eletrocompetentes da linhagem DH5 $\alpha$  (Invitrogen) por eletroporação a 2,5 kV (MicroPulse; BIORAD). Após transformação, as bactérias foram cultivadas a 37°C por 15 h em meio Luria-Bertani (LB) contendo ágar e suplementado com ampicilina (100  $\mu$ g/ml), X-GAL (20  $\mu$ g/ml) e IPTG (40  $\mu$ g/ml). Fez-se a seleção dos clones recombinantes a partir da coloração azul/branco, cujas colônias brancas foram submetidas a PCR com iniciadores específicos para os insertos sob as condições previamente descritas no item 3.5. Assim, os clones selecionados foram crescidos sob agitação por 15 h a 37°C em meio LB líquido contendo ampicilina (LB-amp). Decorrido o tempo de crescimento, os plasmídeos

recombinantes foram extraídos pelo processo padrão de lise alcalina (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

Após a extração dos plasmídeos, realizou-se o sequenciamento dos fragmentos gênicos IMNV<sub>105-297</sub> e IMNV<sub>300-527</sub> clonados em pGEM T-easy fez-se possível graças à colaboração com o Laboratório de Protozoologia da UFSC. Para tal, utilizou-se o kit *DYEnamic® ET Dye Terminator* (GE Healthcare), conforme as instruções do fabricante, sendo a leitura das bases realizada em um equipamento *MegaBACE 1000® DNA Analysis System* (GE Healthcare). A reação de sequenciamento foi realizada na presença de 5 pmol de cada iniciador designado a IMNV<sub>105-297</sub> e IMNV<sub>300-527</sub> e 1 µg do DNA plasmidial, nas seguintes condições térmicas: 95°C por 25 seg, seguidos de 35 ciclos com desnaturação de 95°C por 15 seg, ligação dos iniciadores a 50°C por 20 seg e extensão a 60°C por 90 seg. Os produtos desta reação foram precipitados com álcool isopropílico 70% para a retirada dos nucleotídeos e iniciadores não incorporados, para então serem eletroinjetados a 2 kV por 100 seg e eletroeluidos por 140 min a 7 kV.

O agrupamento de bases foi realizado com auxílio do programa CAP3 (HUANG; MADAN, 1999) e as sequências gênicas obtidas foram posteriormente submetidas à avaliação de qualidade (índice de confiabilidade  $\geq 15$ -20) e agrupadas em sequências consenso pelo programa Phred/Phrap/Consed (EWING et al., 1998). A identidade das sequências nucleotídicas consensos obtidas foram analisadas utilizando-se algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>>) (ALTSCHUL et al., 1997). Ademais, as sequências nucleotídicas obtidas foram alinhadas por CLUSTAL W (THOMPSON et al., 1997) com sequências de isolados de IMNV oriundos do Brasil (*GenBank*: AY570982.1; POULOS et al., 2006) e da Indonésia (*GenBank*: EF061744.1; SENAPIN et al., 2007). A partir da sequência nucleotídica de IMNV<sub>105-297</sub> e

IMNV<sub>300-527</sub>, obtiveram-se as sequências aminoacídicas deduzidas dos mesmos pelo servidor ExPASy (*Expert Protein Analysis System*, disponível em: <<http://ca.expasy.org/>>) e, posteriormente, essas foram alinhadas por CLUSTAL W com as sequências do IMNV presentes no banco de dados previamente descritas. As sequências aminoacídicas deduzidas de rIMNV<sub>105-297</sub> e rIMNV<sub>300-527</sub> também foram analisadas no programa ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>), com o intuito de se verificar as propriedades bioquímicas desses fragmentos proteicos.

Após o sequenciamento, os plasmídeos contendo IMNV<sub>105-297</sub> ou IMNV<sub>300-527</sub> foram clivados pelas enzimas de restrição *XhoI/BamHI* e *NdeI/BamHI*, respectivamente, conforme instruções do fabricante. Os produtos de clivagem foram então submetidos à eletroforese em gel de agarose (1%) e posterior revelação em brometo de etídio, e as bandas correspondentes aos insertos foram purificadas utilizando-se o kit GFX<sup>TM</sup>PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare), seguindo as informações atribuídas pelo fabricante.

Assim, IMNV<sub>105-297</sub> e IMNV<sub>300-527</sub> purificados foram clonados no vetor de expressão pET-14b (Novagen) com o auxílio da enzima T4 DNA Ligase, gerando os plasmídeos pET-IMNV<sub>105-297</sub> e pET-IMNV<sub>300-527</sub>. Esses foram então utilizados na transformação de *E. coli* eletrocompetentes da linhagem BL21(DE3) (Invitrogen) para expressão dos insertos, bem como foram introduzidos em bactérias *E. coli* da cepa DH5α para sequenciamento. O sequenciamento foi realizado nas mesmas condições descritas acima e permitiu verificar que os fragmentos estavam inseridos na fase de leitura correta. Após a seleção das bactérias que receberam o plasmídeo com o inserto por PCR, ensaios de expressão dos fragmentos proteicos de interesse foram subsequentemente realizados.

### 3.7. Expressão heteróloga e purificação de rIMNV<sub>105-297</sub> e rIMNV<sub>300-527</sub>

Após confirmação por PCR da presença dos plasmídeos pET-IMNV<sub>105-297</sub> e pET-IMNV<sub>300-527</sub> em bactérias BL21(DE3), um pré-cultivo dessas colônias foi realizado por 15 h a 37°C sob agitação orbital a 100 rpm para posterior utilização como pré-inóculo para expressão dos insertos. Após o crescimento do pré-inóculo em meio LB-amp à densidade óptica entre 0,4 e 0,6 em espectrofotômetro ( $A_{600}$ ), uma alíquota da cultura foi armazenada como controle não induzido (CNI) e ao restante se adicionou 1 mM do indutor IPTG, submetendo as bactérias a diferentes condições de temperatura e tempos de cultivo pós-indução. Para a expressão de rIMNV<sub>105-297</sub>, as bactérias foram cultivadas com IPTG por 1,5 h e 3 h a 37°C ou 3 h e 15 h a 27°C e 18°C; na expressão de rIMNV<sub>300-527</sub>, as condições de cultivo pós-indução foram 4h a 37°C ou 4 h e 12 h a 27°C e 18°C. Após o período de indução da expressão de proteínas, as bactérias foram precipitadas por centrifugação a 5.000 x g por 10 min. Assim, após suspensão em tampão Tris-HCl 20 mM, pH 7,0, as bactérias foram então sonicadas a 12 W em 4 ciclos de 30 seg no equipamento *Sonic Dismembrator* (Fisher Scientific), centrifugadas a 10.000 x g por 30 min a 4°C, almejando verificar se a proteína expressa se encontra na fração solúvel ou insolúvel das células. Ambos, sobrenadante e precipitado, foram separados para análise em SDS-PAGE 12% em condições redutoras e desnaturantes (LAEMMLI, 1970), sendo o precipitado diluído em SDS 10%.

A fim de se purificar as proteínas rIMNV<sub>105-297</sub> e rIMNV<sub>300-527</sub>, o precipitado de bactérias não sonicadas foi suspenso em tampão desnaturante (CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> 8 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 8,0) e mantido por 1h a 60°C sob agitação. Após centrifugação de 10.000

x g por 30 min a 4°C, o sobrenadante foi incubado em resina de agarose contendo níquel (*Ni-NTA Agarose*, Qiagen) por 1 h sob agitação (100 rpm) e a 4-8°C, pois somente as proteínas que apresentam cauda de poli-histidina apresentam afinidade pelos íons metálicos divalentes presentes na resina, fazendo-se possível a purificação das proteínas recombinantes (LUCAST; BATEY; DOUDNA, 2001; ESHAGHI et al., 2005). Após a incubação, foi adicionado às colunas tampão de lavagem ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  8 M,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 6,0), seguido de adição de tampão de eluição ( $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$  8 M,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100 mM, Tris-HCl 100 mM, pH 4,0).

A eficiência da purificação foi analisada por eletroforese em SDS-PAGE 12% e posterior revelação em Coomassie Blue. Adicionalmente, fez-se um ensaio de Western-blot com anticorpo antipoli-histidina para confirmar a identidade das proteínas expressas. Para tanto, proteínas purificadas e lisado de bactérias expressando rIMNV<sub>105-297</sub> ou rIMNV<sub>300-527</sub> foram submetidos a eletroforese em SDS-PAGE 12% e transferidas para membrana de nitrocelulose (BIORAD) a 25 V por 15 h em tampão de transferência (Tris 25 mM, NaCl 150 mM, metanol 20%), sob refrigeração a 4-8°C (BURNETTI, 1981). Como controle foi transferido lisado de bactérias transformadas com o plasmídeo sem a presença dos insertos. Após a transferência, a membrana foi corada em Ponceau S 1% em ácido acético 10% por 5 min e bloqueada com 5% de leite Mólico (Nestlé®) em TBS-T (Tris 25 mM, NaCl 150 mM, Tween-20 0,1%, pH 7,4) por 2 h sob agitação a temperatura ambiente. Posteriormente, a membrana foi incubada com anticorpo antipoli-histidina (1:10.000) (Sigma-Aldrich) por 1 h a 25°C. Após lavagens com TBS-T, incubou-se a membrana com anticorpo secundário - Anti-Ig GAM murino conjugado à peroxidase (1:5.000) (Sigma-Aldrich) - por 1 h a 25°C. Ambos os anticorpos foram diluídos em TBS-T suplementado com

2% de leite Molico (Nestlé®). Após lavagens, as membranas foram expostas ao reagente ECL (GE-Healthcare) e a reação foi identificada em filmes radiográficos (GE-Healthcare), em câmara escura, seguindo as especificações do fabricante. A seguir, o filme foi incubado em revelador, ácido acético e fixador (Kodak) no processador de filme SRX-101A (Konica-Minolta Medical & Graphic).

Após a certificação por Western-blot, as proteínas purificadas foram dialisadas por 48h com tampão contendo crescente concentração de glicerol até 10% (NaCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM, EDTA 0,05 mM, pH 8,0), a fim de retirar os agentes desnaturantes do meio, permitindo que a proteína readquirir sua estrutura tridimensional. Após diálise, as proteínas foram quantificadas por reação de Bradford (BRADFORD, 1976) para, então, serem utilizadas na imunização de animais.

### **3.8. Imunizações de camundongos com rIMNV<sub>105-297</sub> ou rIMNV<sub>300-527</sub>**

Para a obtenção de células secretoras de anticorpos contra rIMNV<sub>105-297</sub> e rIMNV<sub>300-527</sub>, cinco e três camundongos receberam 50 µg/dose de rIMNV<sub>105-297</sub> ou rIMNV<sub>300-527</sub> purificadas, respectivamente. As imunizações foram realizadas com intervalos de dez dias, sendo a primeira dose administrada pela via subcutânea em presença de Adjuvante Completo de Freund e a segunda dose pela mesma via na presença de Adjuvante Incompleto de Freund. A terceira dose foi realizada pela via intraperitoneal na ausência de adjuvante. Seis dias após a terceira dose, os animais foram sangrados pelo plexo retro-orbital e o sangue coletado com o intuito de se verificar os títulos de anticorpos contra as proteínas recombinantes de interesse. Somente os animais que apresentaram elevados títulos de anticorpos receberam a quarta dose pela via



intraperitoneal e, posteriormente, foram sacrificados por deslocamento cervical para a produção dos hibridomas.

### 3.9. Ensaio de imunoabsorção ligado à enzima

Microplacas de poliestireno de alta afinidade contendo 96 cavidades (Costar<sup>®</sup>) foram utilizadas para titulação dos soros de camundongos imunizados com rIMNV<sub>105-297</sub> ou rIMNV<sub>300-527</sub>, bem como para triagem de hibridomas produtores de AcMo esses fragmentos proteicos. Cada poço foi sensibilizado por 3 h a 37<sup>0</sup>C com 50 ng de rIMNV<sub>105-297</sub> ou rIMNV<sub>300-527</sub> purificados, sendo diluídos em solução carbonato-bicarbonato 0,5 M (pH 9,6). A sensibilidade dos AcMo obtidos também foi avaliada a partir da diluição seriada de rIMNV<sub>105-297</sub> ou rIMNV<sub>300-527</sub> em concentrações que variaram entre 50 pg e 100 ng por poço. Após lavagens com PBS (NaCl 150 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 9,1 mM, pH 7,4) contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T), bloquearam-se os sítios livres com soro albumina bovina (BSA, 3%) (Sigma-Aldrich) por 15 h a 4<sup>0</sup>C. Após lavagens, incubaram-se por 1 h a 37<sup>0</sup>C os sobrenadantes puros de cultura de hibridomas ou soros de camundongos diluídos em solução de bloqueio. Como controle positivo da reação foi utilizado anticorpo antipoli-histina (1:5.000) (Sigma-Aldrich); como controle negativo, utilizou-se meio de cultura livre de células ou soro de camundongo não imunizado. Subsequente a lavagens, incubou-se por 1 h a 37<sup>0</sup>C o anticorpo anti-imunoglobulina total de camundongo conjugado com peroxidase (1:2.500) (Sigma-Aldrich) que foi diluído em solução de bloqueio. Após lavagens, a reação foi revelada adicionando solução substrato-cromógeno orto-fenilenodiamino (OPD 0,4% em 0,1 M de solução tampão citrato-fosfato, pH 5,0, e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3%), sendo a reação interrompida pela adição de 50 µl de

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5 N. Por fim, a leitura da absorbância foi feita a 492 nm pelo leitor de microplacas Sunrise<sup>TM</sup> Basic (Tecan). Foram consideradas positivas as reações com absorbâncias três vezes maiores que as determinadas pelos controles negativos.

### **3.10. Híbridomas**

#### **3.10.1. Obtenção dos esplenócitos**

Quatro dias após a última imunização, os animais que apresentaram maiores títulos de anticorpos séricos contra rIMNV<sub>105-297</sub> ou rIMNV<sub>300-527</sub> foram sacrificados, embebidos em álcool 70% e levados à cabine de segurança biológica para que os esplenócitos fossem coletados do baço em ambiente estéril. As células foram centrifugadas duas vezes a 400 x g por 10 min a temperatura ambiente. Ao precipitado celular foram adicionados 5 ml de solução de lise de hemácias (NH<sub>4</sub>Cl 168 mM, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,4), deixando incubar por 5 min. A suspensão de esplenócitos foi novamente centrifugada nas mesmas condições e, após suspensão em meio RPMI-1640 (Cultilab), as células viáveis foram contadas em câmara de Neubauer utilizando corante Azul de Tripán 2% na proporção de 1:1.

#### **3.10.2. Células de mieloma**

Células de mieloma murinos da linhagem P3X63Ag8.653 (número no ATCC<sup>®</sup>: CRL-1580) (KEARNEY et al., 1978) foram cultivados em garrafas de cultura contendo meio RPMI-1640 acrescido de 20% de soro fetal bovino (SFB) e solução antibiótica e antifúngica (1x10<sup>5</sup> U de penicilina, 0,1 µg de estreptomicina, 250 µg de anfotericina B por litro de meio) (PSA) a 37 °C em

incubadoras contendo 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram centrifugadas a 400 x g por 5 min a temperatura ambiente, sendo o precipitado suspenso em RPMI-1640 para, então, contar as células viáveis.

### 3.10.3. Produção e manutenção dos hibridomas

Células de mielomas e esplenócitos foram misturados na proporção de 1:5 e lavadas duas vezes com meio RPMI com o posterior descarte do sobrenadante. Para a realização da fusão, adicionou-se sobre o botão celular 1 ml de polietilenoglicol 4000 (Sigma-Aldrich) a 50% como agente fusonante, homogeneizando por 2 min. Após este período, acrescentou-se meio de cultura e centrifugaram-se as células por 5 min a 400 x g em temperatura ambiente. Após o ajuste da concentração de células para  $2,5 \times 10^6$  células/ml, adicionaram-se 100 µl da suspensão celular por poço de placas de cultura de 96 cavidades.

Após 24 h, 100 µl de meio HAT (hipoxantina 5 mM, aminopterina 20 µM, timidina 80 mM) acrescido de 20% de SFB e PSA foram adicionados em cada cavidade. Por 13 dias, o meio foi trocado de 48 em 48 h e, no 15º dia pós-fusão, o meio foi substituído por meio HT (hipoxantina 5 mM, timidina 80 mM) com 20% de SFB e PSA. No 19º dia, o meio foi substituído por meio RPMI acrescido de 20% de SFB e PSA. Quando as células ocuparam 2/3 da cavidade da placa, o sobrenadante de cultura foi coletado e testado quanto à presença de anticorpos reativos contra rIMNV<sub>105-297</sub> ou rIMNV<sub>300-527</sub> por ELISA indireto. Somente os clones cujo sobrenadante apresentou reatividade contra as proteínas recombinantes foram clonados por duas diluições limitantes, a fim de garantir a sua monoclonalidade (KÖHLER; MILSTEIN, 1975; YOKOYAMA et al., 2006).

#### 3.10.4. Criopreservação de hibridomas

Hibridomas em expansão foram regularmente estocados em nitrogênio líquido. Para tanto, a suspensão de células em garrafas de cultura foi centrifugada a 400 x g por 5 min a 4°C e ao precipitado celular foi adicionado meio de congelamento contendo 50% de meio RPMI, 40% de SFB e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich). A seguir,  $2-5 \times 10^6$  células foram distribuídas em criotubos, mantidos por 24 h a -80°C, seguido de transferência para nitrogênio líquido.

#### 3.11. Isotipagem

Classes e subclasses dos anticorpos monoclonais obtidos foram determinadas utilizando-se o *kit* de isotipagem *Clonotyping System* (Southern Biotech), procedendo-se conforme as instruções do fabricante descritas a seguir. Quinhentas ng de anticorpos de captura anti-imunoglobulina total de camundongo foram adicionados em cada poço de microplacas de poliestireno, deixando incubar por 12 h a 4°C em atmosfera úmida. Após esse período, o bloqueio dos sítios inespecíficos dos poços foi feito com BSA (1%) em PBS por 1 h a 25°C. Posterior as lavagens, sobrenadantes puros de cultura de hibridomas foram adicionados em cada cavidade e incubados por 1 h a temperatura ambiente sob agitação. Após lavagens, anticorpos secundários conjugados com peroxidase (anti-Ig total, anti-IgM, anti-IgG<sub>1</sub>, anti-IgG<sub>2a</sub>, anti-IgG<sub>2b</sub>, anti-IgG<sub>3</sub>, anti-IgA) diluídos 1:500 em PBS/BSA 1% foram adicionados em cada poço e mantidos por 1 h, a temperatura ambiente, sob agitação. A reação foi revelada com 30 µg de ABTS em presença de 0,3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por poço e a quantificação realizada no leitor de microplacas Sunrise<sup>TM</sup> Basic (Tecan) a 450 nm.

### **3.12. Reatividade dos anticorpos monoclonais frente a tecido de camarão infectado por IMNV**

Para avaliar a especificidade dos AcMo anti-rIMNV<sub>105-297</sub> ou anti-rIMNV<sub>300-527</sub> contra a proteína nativa do capsídeo do IMNV, bem como avaliar a ausência de reatividade contra demais proteínas de tecidos do camarão, realizaram-se ensaios de imunodot-blot, Western-blot e imunohistoquímica.

#### **3.12.1. Imunodot-blot e Western-blot**

Amostras congeladas de tecido muscular esquelético de espécimes de *L. vannamei* infectadas ou não-infectadas por IMNV foram inicialmente lavadas com tampão de lavagem (Tris 200  $\mu$ M, NaCl 400 mM, pH 7,4) por centrifugações de 10 min a 10.000 x g. Após pesagem do material biológico, adicionou-se tampão de lavagem num volume equivalente a três vezes o peso da amostra. A seguir, os tecidos foram macerados e sonicados por três ciclos de 30 seg a 12 W com o auxílio do equipamento *60 Sonic Dismembrator* (Fisher Scientific). Após processamento, os lisados foram submetidos à quantificação proteica pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), sendo então armazenados a -20°C.

Os ensaios de imunodot-blot foram realizados com o intuito de se avaliar a especificidade dos AcMo frente à tecido de camarão infectado por IMNV na ausência de agentes desnaturantes, bem como determinar a sensibilidade dos AcMo mediante redução das concentrações do antígeno. Para tanto, os lisados não-infectados e infectados por IMNV foram aplicados em membrana de nitrocelulose em concentrações protéicas que variaram de 2  $\mu$ g a 3 ng, deixando as membranas

secarem a temperatura ambiente. A sensibilidade dos AcMo frente às proteínas recombinantes também foi avaliada por diluições seriadas de rIMNV<sub>105-297</sub> ou rIMNV<sub>300-527</sub> cujas concentrações variaram entre 75 pg e 90 ng.

As análises por Western-blot foram realizadas a fim de se verificar a especificidade de ligação dos AcMo frente à proteína do capsídeo do IMNV cujo peso molecular é de ~ 100 kDa (TANG et al., 2008). Para tanto, 90 ng de rIMNV<sub>105-297</sub> ou rIMNV<sub>300-527</sub> e 3 µg de cada lisado - não-infectado e infectado por IMNV - foram submetidos a separação eletroforética em SDS-PAGE 12% sob condições redutoras e desnaturantes e posterior transferência em membrana de nitrocelulose a 100 V por 1 h em tampão de transferência.

Ambas as membranas preparadas para os ensaios de imunodot-blot e Western-blot foram bloqueadas com 5% de leite desnatado Molico® em TBS-T por 90 min, sob agitação, a temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram incubadas com sobrenadantes puros de cultura de hibridomas secretores de AcMo anti-rIMNV<sub>105-297</sub> ou anti-rIMNV<sub>300-527</sub> por 1 h a temperatura ambiente. Após lavagens com TBS-T, incubaram-se as membranas com anticorpo secundário - Anti-Ig GAM murino conjugado à peroxidase (1:5.000) por 1 h a temperatura ambiente. Após lavagens, a revelação foi realizada conforme procedimentos previamente descritos no item 3.7.

### 3.12.2. Imunohistoquímica

Camarões *L. vannamei* cuja infecção por IMNV foi confirmada por PCR foram fixados por 48 h com fixador de Davidson (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O 31%, formalina 22%, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub> 12%, pH 3,0-4,0), seguido de lavagens com etanol 70% para remoção do fixador até a estabilização do pH em 6,5 (HUMASON, 1979; ANDRADE; REDMAN; LIGHTNER, 2008). Após desidratação com álcool etílico em concentrações crescentes, o tecido foi diafanizado com xilol, incluso em parafina e seccionado a 3 µm de espessura com o auxílio de micrótomo. Após hidratação, os cortes foram tratados com tampão citrato trisódio 10 mM (pH 6,0) a 95-98°C por 45 min, a fim de realizar a recuperação antigênica das proteínas do tecido (SHI; KEY; KALRA, 1991). O bloqueio foi realizado com soro caprino (2%) por 30 min a temperatura ambiente, seguido de incubação com sobrenadantes puros de cultura de hibridomas contendo AcMo anti-rIMNV<sub>105-297</sub> ou anti-rIMNV<sub>300-527</sub> por 15 h a 4°C. Como controles foram utilizados tecidos sadios incubados com os anti-rIMNV<sub>105-297</sub> ou anti-rIMNV<sub>300-527</sub> e tecidos infectados incubados com AcMo antirábico. Após lavagens com PBS, incubaram-se as lâminas com anticorpo secundário e revelador do kit *Envision<sup>TM</sup> plus horseradish peroxidase* (Dako Cytomation), seguido de contracoloração com hematoxilina de Harris. As imagens foram adquiridas e digitalizadas utilizando-se o microscópio *Eclipse 50i* acoplado com a câmara DS-5M-L1 (Nikon).





## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Amplificação, clonagem e sequenciamento de IMNV<sub>105-297</sub> e IMNV<sub>300-527</sub>

Almejando o desenvolvimento de imunoenaios com AcMo específicos contra a proteína do capsídeo do IMNV, optou-se pela estratégia de produção *in vitro* de proteínas recombinantes expressas em sistema procariótico a serem utilizadas na imunizações de animais. A expressão heteróloga de proteínas confere vantagens quando comparadas com a obtenção da proteína nativa, uma vez que a última apresenta árduo processo de purificação e baixo rendimento. A obtenção de proteína nativa requer primeiramente a purificação do vírus e, uma vez que as imunizações são realizadas com elevada concentração de antígeno, precisa-se de um grande número de animais infectados com alta carga viral. Não obstante, amostras contendo proteínas virais purificadas oriundas de animais infectados podem trazer consigo proteínas do próprio tecido do camarão, gerando a possibilidade de obtenção de anticorpos que reajam contra essas proteínas. Visto que o uso desses anticorpos é indesejado em testes de imunodeteção, pois podem fornecer resultados falso-positivos, justifica-se a escolha do modelo de expressão neste estudo.

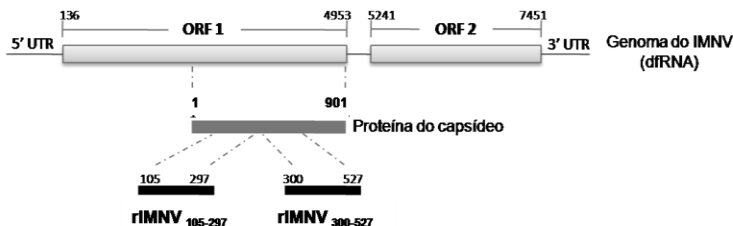
Sistemas heterólogos de expressão proteica, especialmente aqueles que utilizam micro-organismos procarióticos, são amplamente utilizados para síntese de proteínas de diferentes origens, pois apresentam diversas vantagens, tais como: i) cultivo simples, rápido e de alta densidade; ii) genoma e mecanismos de transcrição e tradução bem conhecidos; iii) disposição de diversas ferramentas compatíveis para clonagem, expressão e

purificação de proteínas recombinantes (SORENSEN; MORTENSEN, 2005). Assim, o uso desse sistema na expressão de proteínas de vírus de camarão é de grande valia, pois permite a imunização de animais com elevadas concentrações de proteína, bem como o processo de triagem dos AcMo.

O uso do sistema bacteriano para expressão de proteínas de vírus que acometem camarões tem sido amplamente utilizado na produção de anticorpos (SITHIGORNGUL et al., 2009; CHAIVISUTHANGKURA et al., 2010 a,b). Entretanto, a expressão heteróloga não se restringe à produção de antígenos, mas também é utilizada para a síntese de anticorpos recombinantes, como os produzidos contra YHV e WSSV (INTORASOOT et al., 2007; WANG et al., 2008). A partir desses anticorpos, diversos imunoenaios vêm sendo padronizados com intuito de ampliar as opções de diagnósticos de viroses que acometem camarões.

Inúmeros testes de imunodeteção são confeccionados com a combinação de dois ou mais anticorpos, tornando-se interessante a utilização de anticorpos que reconheçam epítomos distintos, reduzindo assim a probabilidade de impedimento alostérico de ligação, bem como a competição entre os anticorpos. Assim sendo, IMNV<sub>105-297</sub> e IMNV<sub>300-527</sub>, dois fragmentos do gene que codifica a proteína do capsídeo do IMNV, foram escolhidos para serem amplificados, clonados e expressos em *E. coli*. Para tanto, iniciadores para esses dois fragmentos foram desenhados a partir de sequência nucleotídica disponível em banco de dados da proteína do capsídeo do IMNV. O gene da proteína do capsídeo do IMNV localiza-se na ORF-1 do genoma RNA dupla fita desse vírus, sendo constituída por 901 aminoácidos e apresentando peso molecular de 99 kDa (POULOS et al., 2006; TANG et al., 2008). IMNV<sub>105-297</sub> codifica os aminoácidos da posição 105 (Alanina, Ala) à 297 (Triptofano, Try); IMNV<sub>300-527</sub> compreende o aminoácido

Treonina (Thr) da posição 300 até o aminoácido Leucina (Leu) da posição 527 (Figura 4).

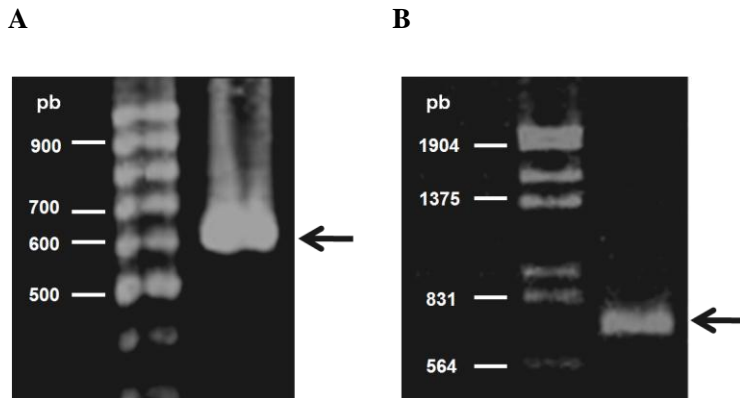


**Figura 4.** Esquema do genoma do IMNV e dos fragmentos rIMNV<sub>105-297</sub> e rIMNV<sub>300-527</sub>. Genoma RNA dupla fita (dfRNA) do IMNV contendo duas fases de leitura (ORF-1 e ORF-2), cuja ORF-1 codifica a proteína do capsídeo viral que perfaz 901 aminoácidos. Dois fragmentos de baixa hidrofobicidade da proteína do capsídeo do IMNV, rIMNV<sub>105-297</sub> e rIMNV<sub>300-527</sub>, foram escolhidos para serem expressos em *E. coli*. rIMNV<sub>105-297</sub> e rIMNV<sub>300-527</sub> contemplam os resíduos aminoácídicos Ala-105 a Try-297 e Thr-300 a Leu-527, respectivamente.

A partir dos iniciadores confeccionados, fez-se a amplificação dos fragmentos desejados por RT-PCR utilizando-se o material genético obtido de camarões *L. vannamei* que apresentavam sinais de IMNV coletados em 2007. Bandas de aproximadamente 850 pares de bases foram obtidas da reação com iniciadores para actina (dados não mostrados), validando as amostras para posterior amplificação com iniciadores específicos para IMNV<sub>105-297</sub> ou IMNV<sub>300-527</sub>.

Assim sendo, a partir da PCR utilizando os iniciadores desenhados, visualizaram-se bandas únicas de 598 e 697 pares de bases correspondentes a IMNV<sub>105-297</sub> e

IMNV<sub>300-527</sub>, respectivamente (Figura 5). A amplificação desses fragmentos confirmou a presença do IMNV nestes camarões, demonstrando que o vírus permanece em circulação no Brasil cinco anos após seu primeiro relato em 2002 (NUNES; MARTINS; GESTEIRA, 2004).



**Figura 5.** Produtos de amplificação obtidos por RT-PCR utilizando iniciadores específicos para dois fragmentos do gene da proteína do capsídeo do IMNV. Géis de agarose 1% corados com brometo de etídio contendo produtos de RT-PCR amplificados a partir de RNA total extraído de camarões sintomáticos para IMNV. (A) produto de amplificação de 598 pb referente a IMNV<sub>105-297</sub>; (B) produto de amplificação de 697 pb referente a IMNV<sub>300-527</sub>.

Após a amplificação dos fragmentos de interesse, esses foram ligados ao vetor de clonagem pGEM T-easy, gerando os plasmídeos pGEM-IMNV<sub>105-297</sub> e pGEM-IMNV<sub>300-527</sub> que foram utilizados na transformação de bactérias competentes *E. coli* DH5α. *E. coli* DH5α são amplamente utilizadas em clonagens e apresentam a vantagem de armazenar um elevado número de cópias

plasmidiais no citoplasma, posto que não expressa endonucleases de restrição do tipo I que atuam na digestão de plasmídeos (GRANT et al., 1990).

Assim, bactérias DH5 $\alpha$  transformadas com pGEM-IMNV<sub>105-297</sub> e pGEM-IMNV<sub>300-527</sub> foram cultivadas em meio LB ágar contendo X-GAL. Colônias brancas foram selecionadas e a presença dos plasmídeos contendo os insertos foi confirmada por PCR (dados não mostrados). Algumas das colônias positivas no PCR foram submetidas à extração plasmidial para posterior sequenciamento utilizando os iniciadores específicos para os fragmentos IMNV<sub>105-297</sub> ou IMNV<sub>300-527</sub>.

O sequenciamento de ambas sequências senso e antisenso de IMNV<sub>105-297</sub> e IMNV<sub>300-527</sub> presentes no vetor pGEM T-easy confirmou a identidade dos fragmentos como sequências do gene do capsídeo de IMNV. Ademais, os sequenciamentos revelaram-se de alta qualidade, uma vez que a análise pelo programa Phred/Phrap/Consed demonstrou índice Phred acima de 20 para IMNV<sub>105-297</sub> e acima de 15 para IMNV<sub>300-527</sub> (EWING et al., 1998). Devido à alta confiabilidade dos sequenciamentos, as sequências nucleotídicas e aminoácídicas deduzidas de IMNV<sub>105-297</sub> e IMNV<sub>300-527</sub> foram depositadas no banco de dados *GenBank*TM/EBI com números de acesso HM357803.1 e HM030799.1, respectivamente.

As sequências nucleotídicas e aminoácídicas deduzidas de IMNV<sub>105-297</sub> e IMNV<sub>300-527</sub> foram alinhadas por CLUSTAL W com o intuito de verificar possíveis similaridades ou divergências com sequências já depositadas em bancos de dados. Dentre essas, encontram-se disponíveis as sequências de um isolado viral coletado no Brasil em 2003 por Poulos e colaboradores (2006) (*GenBank*: AY570982.1) e um isolado coletado na ilha de Java na Indonésia em 2006 por Senapin e colaboradores (2007) (*GenBank*: EF061744.1). Análises comparativas entre essas duas sequências demonstram identidade de 99,6% entre seus nucleotídeos, havendo divergência em 29

deles (SENAPIN et al., 2007). Dentre esses 29 nucleotídeos, 22 deles localizavam-se na ORF-1 do genoma do IMNV, posição em que se encontra o gene da proteína do capsídeo viral. A ocorrência de 22 nucleotídeos distintos revelou a presença de 11 aminoácidos diferentes na proteína do capsídeo do IMNV desses dois isolados (SENAPIN et al., 2007).

Análises de similaridade por CLUSTAL W demonstraram que IMNV<sub>105-297</sub> apresentou 99% de seus nucleotídeos idênticos aos da sequência de IMNV do Brasil, diferindo as bases nitrogenadas das posições 84 (de G para A) e 569 (de T para G) (Figura 6). No entanto, quando comparado com a sequência de IMNV da Indonésia, a identidade foi de 98% e as divergências ocorreram nas posições 84 (de G para A), 189 (de G para A), 318 (de C para T), 356 (de C para T) e 569 (de T para G) (Figura 6).

O alinhamento da sequência nucleotídica de IMNV<sub>300-527</sub> com a sequência de IMNV do Brasil também revelou 99% de identidade entre os nucleotídeos. As divergências ocorreram em cinco bases nitrogenadas, cujas posições são: 169 (de A para G), 564 (de T para C), 636 (de A para T), 646 (de G para A) e 652 (de T para C) (Figura 7). No entanto, ao comparar IMNV<sub>300-527</sub> com a sequência de IMNV da Indonésia, a identidade foi de 98%, cujas nove divergências ocorreram nas posições 169 (de A para G), 250 (de T para C), 530 (de A para T), 564 (de T para C), 609 (de T para C), 625 (de A para G), 636 (de A para T), 646 (de G para A) e 652 (de T para C) (Figura 7).

|                         |  |      |
|-------------------------|--|------|
| IMNV <sub>105-297</sub> | CAATTACGGTTACAGGGAATTGAAACACACATTACAGACAGTTATATTTTC        | 50   |
| IMNV-Bra                | CAATTACGGTTACAGGGAATTGAAACACACATTACAGACAGTTATATTTTC        | 2588 |
| IMNV-Ind                | CAATTACGGTTACAGGGAATTGAAACACACATTACAGACAGTTATATTTTC        | 2588 |
| IMNV <sub>105-297</sub> | AAAAGCTGAGCCATCTGACTATTGAAACAAC <b>TCT</b> GAAATGGTTAATG   | 100  |
| IMNV-Bra                | AAAAGCTGAGCCATCTGACTATTGAAACAAC <b>TCT</b> GAAATGGTTAATG   | 2638 |
| IMNV-Ind                | AAAAGCTGAGCCATCTGACTATTGAAACAAC <b>TCT</b> GAAATGGTTAATG   | 2638 |
| IMNV <sub>105-297</sub> | CTCAAAAGACATCAACTTGGCGAGCAACAATATCGCATCACAGGGGTGG          | 150  |
| IMNV-Bra                | CTCAAAAGACATCAACTTGGCGAGCAACAATATCGCATCACAGGGGTGG          | 2688 |
| IMNV-Ind                | CTCAAAAGACATCAACTTGGCGAGCAACAATATCGCATCACAGGGGTGG          | 2688 |
| IMNV <sub>105-297</sub> | GACATGTTTGATACTGTACAGTTAAATACAAACATAT <b>C</b> CAAAAAGATCT | 200  |
| IMNV-Bra                | GACATGTTTGATACTGTACAGTTAAATACAAACATAT <b>C</b> CAAAAAGATCT | 2738 |
| IMNV-Ind                | GACATGTTTGATACTGTACAGTTAAATACAAACATAT <b>C</b> CAAAAAGATCT | 2738 |
| IMNV <sub>105-297</sub> | TTCAATGGACACTGCTTTGACAAAGCTTATGTTGTTGTACCAGCTAACAA         | 250  |
| IMNV-Bra                | TTCAATGGACACTGCTTTGACAAAGCTTATGTTGTTGTACCAGCTAACAA         | 2788 |
| IMNV-Ind                | TTCAATGGACACTGCTTTGACAAAGCTTATGTTGTTGTACCAGCTAACAA         | 2788 |
| IMNV <sub>105-297</sub> | CACAAAATCTGCCAGCAACACAATTACCATCAAGCATTTATTCTGCATTT         | 300  |
| IMNV-Bra                | CACAAAATCTGCCAGCAACACAATTACCATCAAGCATTTATTCTGCATTT         | 2838 |
| IMNV-Ind                | CACAAAATCTGCCAGCAACACAATTACCATCAAGCATTTATTCTGCATTT         | 2838 |
| IMNV <sub>105-297</sub> | GATTCAAGAACACAGCC <b>A</b> CTTTACAGGATGGAATTTGGGGTATAAATAA | 350  |
| IMNV-Bra                | GATTCAAGAACACAGCC <b>A</b> CTTTACAGGATGGAATTTGGGGTATAAATAA | 2888 |
| IMNV-Ind                | GATTCAAGAACACAGCC <b>A</b> CTTTACAGGATGGAATTTGGGGTATAAATAA | 2888 |
| IMNV <sub>105-297</sub> | TGGT <b>G</b> TAATATATTTGGTGAACAATGCGGTGGATTAGCCGCGCCAGTCT | 400  |
| IMNV-Bra                | TGGT <b>G</b> TAATATATTTGGTGAACAATGCGGTGGATTAGCCGCGCCAGTCT | 2938 |
| IMNV-Ind                | TGGT <b>G</b> TAATATATTTGGTGAACAATGCGGTGGATTAGCCGCGCCAGTCT | 2938 |
| IMNV <sub>105-297</sub> | TTCCATTCACTGGGGGCACCGGAGAAATTACTTTCCATCTTACTTTACAA         | 450  |
| IMNV-Bra                | TTCCATTCACTGGGGGCACCGGAGAAATTACTTTCCATCTTACTTTACAA         | 2988 |
| IMNV-Ind                | TTCCATTCACTGGGGGCACCGGAGAAATTACTTTCCATCTTACTTTACAA         | 2988 |
| IMNV <sub>105-297</sub> | TCTGTTCCACAGGAATTTCAAGAATCAGCAATTTTCGTACCAGCAACTGC         | 500  |
| IMNV-Bra                | TCTGTTCCACAGGAATTTCAAGAATCAGCAATTTTCGTACCAGCAACTGC         | 3038 |
| IMNV-Ind                | TCTGTTCCACAGGAATTTCAAGAATCAGCAATTTTCGTACCAGCAACTGC         | 3038 |
| IMNV <sub>105-297</sub> | ACTACAAGCTGCAAAAGAGGGTGCTCGAACATTGGCAATGTATGTTTTAA         | 550  |
| IMNV-Bra                | ACTACAAGCTGCAAAAGAGGGTGCTCGAACATTGGCAATGTATGTTTTAA         | 3088 |
| IMNV-Ind                | ACTACAAGCTGCAAAAGAGGGTGCTCGAACATTGGCAATGTATGTTTTAA         | 3088 |
| IMNV <sub>105-297</sub> | TGTTTGCAAGATGGCCAT <b>T</b> TGGTATGTATAC                   | 581  |
| IMNV-Bra                | TGTTTGCAAGATGGCCAT <b>T</b> TGGTATGTATAC                   | 3119 |
| IMNV-Ind                | TGTTTGCAAGATGGCCAT <b>T</b> TGGTATGTATAC                   | 3119 |

**Figura 6.** Alinhamento múltiplo da sequência nucleotídica de IMNV<sub>105-297</sub> com sequências homólogas da proteína do capsídeo de IMNV. Análise por CLUSTAL W da localização de substituições nucleotídicas na sequência de IMNV<sub>105-297</sub> por comparação com isolados virais do Brasil (*GenBank*: AY570982.1) e da Indonésia (*GenBank*: EF061744.1). Bases nitrogenadas divergentes para sequências do Brasil e da Indonésia estão destacadas em preto; em cinza estão destacadas as bases que divergem para a sequência da Indonésia.

|                         |   |      |
|-------------------------|---|------|
| IMNV <sub>300-527</sub> | ACTAAACAAACACAGACAATGCTGGTAATAATCAATCAGATCAAATTTT   | 50   |
| IMNV-Bra                | ACTAAACAAACACAGACAATGCTGGTAATAATCAATCAGATCAAATTTT   | 3173 |
| IMNV-Ind                | ACTAAACAAACACAGACAATGCTGGTAATAATCAATCAGATCAAATTTT   | 3173 |
| IMNV <sub>300-527</sub> | CATTCACTCCGAATCTACTGTACATATTCAGGACAAAAACAATGCATA    | 100  |
| IMNV-Bra                | CATTCACTCCGAATCTACTGTACATATTCAGGACAAAAACAATGCATA    | 3223 |
| IMNV-Ind                | CATTCACTCCGAATCTACTGTACATATTCAGGACAAAAACAATGCATA    | 3223 |
| IMNV <sub>300-527</sub> | TTGTGCTGCCAAGAAAAGTGAACATGGTGAACCCCACTACAATTGCAGAA  | 150  |
| IMNV-Bra                | TTGTGCTGCCAAGAAAAGTGAACATGGTGAACCCCACTACAATTGCAGAA  | 3273 |
| IMNV-Ind                | TTGTGCTGCCAAGAAAAGTGAACATGGTGAACCCCACTACAATTGCAGAA  | 3273 |
| IMNV <sub>300-527</sub> | GCAAAATGCACGTGTAGTAATTCAACCAACATACGGTACAGTGGCAGCTGG | 200  |
| IMNV-Bra                | GCAAAATGCACGTGTAGTAATTCAACCAACATACGGTACAGTGGCAGCTGG | 3323 |
| IMNV-Ind                | GCAAAATGCACGTGTAGTAATTCAACCAACATACGGTACAGTGGCAGCTGG | 3323 |
| IMNV <sub>300-527</sub> | GGCAGGTGTCGCAAAATGGTAATATTAACGTAGCTGCTGTTGGTGTGGCC  | 250  |
| IMNV-Bra                | GGCAGGTGTCGCAAAATGGTAATATTAACGTAGCTGCTGTTGGTGTGGCC  | 3373 |
| IMNV-Ind                | GGCAGGTGTCGCAAAATGGTAATATTAACGTAGCTGCTGTTGGTGTGGCC  | 3373 |
| IMNV <sub>300-527</sub> | TGCCAACTGTAAATTTGACTGACTATCTTGTATCCTGGGCAACCGATTTC  | 300  |
| IMNV-Bra                | TGCCAACTGTAAATTTGACTGACTATCTTGTATCCTGGGCAACCGATTTC  | 3423 |
| IMNV-Ind                | TGCCAACTGTAAATTTGACTGACTATCTTGTATCCTGGGCAACCGATTTC  | 3423 |
| IMNV <sub>300-527</sub> | ACACTTGGCGACATAAAACAATTGGTTGAAAGAATGAAAACAACACTGCC  | 350  |
| IMNV-Bra                | ACACTTGGCGACATAAAACAATTGGTTGAAAGAATGAAAACAACACTGCC  | 3474 |
| IMNV-Ind                | ACACTTGGCGACATAAAACAATTGGTTGAAAGAATGAAAACAACACTGCC  | 3473 |
| IMNV <sub>300-527</sub> | AATTAGTCGAGACTTGATGGCAGCAGTCAAAATGCTATGTTATTAGTA    | 400  |
| IMNV-Bra                | AATTAGTCGAGACTTGATGGCAGCAGTCAAAATGCTATGTTATTAGTA    | 3523 |
| IMNV-Ind                | AATTAGTCGAGACTTGATGGCAGCAGTCAAAATGCTATGTTATTAGTA    | 3523 |
| IMNV <sub>300-527</sub> | CTCTATTTCTCCACTAATTCAGAGCAATGTGGCTTCAGACACAAAGGAA   | 450  |
| IMNV-Bra                | CTCTATTTCTCCACTAATTCAGAGCAATGTGGCTTCAGACACAAAGGAA   | 3573 |
| IMNV-Ind                | CTCTATTTCTCCACTAATTCAGAGCAATGTGGCTTCAGACACAAAGGAA   | 3573 |
| IMNV <sub>300-527</sub> | GTCCCAGGAACAGCTGGAGCATACACTGCATGTCTTGCAAACCTTAGGTAT | 500  |
| IMNV-Bra                | GTCCCAGGAACAGCTGGAGCATACACTGCATGTCTTGCAAACCTTAGGTAT | 3623 |
| IMNV-Ind                | GTCCCAGGAACAGCTGGAGCATACACTGCATGTCTTGCAAACCTTAGGTAT | 3623 |
| IMNV <sub>300-527</sub> | TCCTGAAACACTAACAGTTAACTGGGGAGAGATATAAATGTTACGCCAT   | 550  |
| IMNV-Bra                | TCCTGAAACACTAACAGTTAACTGGGGAGAGATATAAATGTTACGCCAT   | 3673 |
| IMNV-Ind                | TCCTGAAACACTAACAGTTAACTGGGGAGAGATATAAATGTTACGCCAT   | 3673 |
| IMNV <sub>300-527</sub> | TGTATCAGCTACTGSAACGGACATCACAGCCCAATCGGTACGTATTA     | 600  |
| IMNV-Bra                | TGTATCAGCTACTGSAACGGACATCACAGCCCAATCGGTACGTATTA     | 3723 |
| IMNV-Ind                | TGTATCAGCTACTGSAACGGACATCACAGCCCAATCGGTACGTATTA     | 3723 |
| IMNV <sub>300-527</sub> | AACCTGTTAAAAAGAGAAGAAGTGCTAGCAGGTGCTATGAATTTGGTG    | 650  |
| IMNV-Bra                | AACCTGTTAAAAAGAGAAGAAGTGCTAGCAGGTGCTATGAATTTGGTG    | 3773 |
| IMNV-Ind                | AACCTGTTAAAAAGAGAAGAAGTGCTAGCAGGTGCTATGAATTTGGTG    | 3773 |
| IMNV <sub>300-527</sub> | GTTGGGACACATGGCCAGTTATATGATGGGACTCC                 | 685  |
| IMNV-Bra                | GTTGGGACACATGGCCAGTTATATGATGGGACTCC                 | 3808 |
| IMNV-Ind                | GTTGGGACACATGGCCAGTTATATGATGGGACTCC                 | 3808 |

**Figura 7.** Alinhamento múltiplo da sequência nucleotídica de IMNV<sub>300-527</sub> com sequências homólogas da proteína do capsídeo de IMNV. Análise por CLUSTAL W da localização de substituições nucleotídicas na sequência de IMNV<sub>300-527</sub> por comparação com isolados virais do Brasil (*GenBank*: AY570982.1) e da Indonésia (*GenBank*: EF061744.1). Bases nitrogenadas



divergentes para as sequências do Brasil e da Indonésia estão destacadas em preto; em cinza estão destacadas as bases que divergem para a sequência da Indonésia.

Assim, quando analisados os alinhamentos feitos entre IMNV<sub>105-297</sub> e IMNV<sub>300-527</sub> com as sequências do Brasil e da Indonésia, identificaram-se dois nucleotídeos que são únicos de IMNV<sub>105-297</sub> e cinco outros nucleotídeos únicos da sequência de IMNV<sub>300-527</sub>. No entanto, sete nucleotídeos estão modificados apenas no isolado da Indonésia.

É sólido que mutações gênicas em vírus são bastante comuns, principalmente nos vírus que apresentam genoma RNA, como o IMNV. Além disso, mutações decorrentes de isolamento geográfico são recorrentes entre vírus que acometem camarões, como ocorreu com o IMNV na dispersão do Brasil para Indonésia (SENAPIN et al., 2007). Existem relatos da ocorrência de grandes variações gênicas entre regiões distintas de WSSV, que é um vírus de DNA, como reportado por Marks e colaboradores (2004). Nesse trabalho, isolados de WSSV originários da China, Taiwan e Indonésia apresentaram até 13.000 pares de bases divergentes (MARKS et al., 2004). Portanto, essas são as possíveis razões que justificam as alterações presentes unicamente no isolado da Indonésia, uma vez que os vírus que permaneceram no Brasil não apresentaram essas mutações.

Ademais, alterações dentre isolados da mesma região geográfica já foram reportados para o WSSV por Tan e colaboradores (2009) que analisaram isolados de sete fazendas da China e verificaram a presença de dois novos isolados (TAN et al., 2009). Variações importantes no genoma do WSSV também foram encontradas em fazendas da Tailândia durante casos de epidemias que ocorreram em 2000 e 2002 (WONGTEERASUPAYA et

al., 2003). Pode-se concluir, portanto, que ao longo dos anos de 2003 a 2007 - períodos de coleta do primeiro isolado do Brasil e do isolado que obtivemos no presente trabalho, respectivamente - o IMNV presente no Brasil possivelmente sofreu as mutações que foram identificadas nas sequências IMNV<sub>105-297</sub> e IMNV<sub>300-527</sub>. No entanto, mais estudos precisam ser realizados para confirmar tal constatação, pois se trata apenas da análise de um único isolado e estudos epidemiológicos requerem a avaliação de um número maior de indivíduos para se identificar o atual genoma de um vírus circulante.

Análises comparativas das sequências aminoacídicas deduzidas de IMNV<sub>105-297</sub> e IMNV<sub>300-527</sub> por BLAST revelaram o mesmo percentual de homologia observados na sequência nucleotídica, ou seja, tanto IMNV<sub>105-297</sub> quanto IMNV<sub>300-527</sub> apresentaram identidade de 99% e 98% com as sequências do IMNV do Brasil e da Indonésia, respectivamente. Essa alta identidade entre os fragmentos com isolados virais desses dois países sugere que seus epítomos são ubíquos entre diferentes isolados, permitindo que os anticorpos que os reconheçam sejam utilizados em testes de diagnósticos aplicáveis em diversas regiões do globo. Entretanto, anticorpos contra regiões que apresentam pequenas alterações na sequência aminoacídica podem apresentar diferentes afinidades de ligação aos seus epítomos, repercutindo em possíveis diagnósticos falsos negativos.

Dentre as alterações das sequências aminoacídicas deduzidas, pode-se identificar a ocorrência de substituições sinônimas e não sinônimas. De cinco alterações nucleotídicas na sequência de IMNV<sub>105-297</sub>, duas geraram modificações na sequência de aminoácidos, estando localizados nas posições 223 e 294 (Figura 8). O primeiro aminoácido diverge apenas para a sequência da Indonésia, cujos IMNV<sub>105-297</sub> e a sequência do Brasil apresentam o aminoácido alanina (A) e a sequência da Indonésia o aminoácido valina (V). O segundo aminoácido é singular

à sequência IMNV<sub>105-297</sub>, posto que ambas sequências do Brasil e da Indonésia apresentam o aminoácido cisteína (C) e IMNV<sub>105-297</sub> apresenta o aminoácido fenilalanina (F).

IMNV<sub>300-527</sub> apresentou um número maior de alterações na sequência aminoacídica deduzida, onde quatro de nove alterações nucleotídicas representaram mutações não sinônimas, repercutindo na presença de quatro aminoácidos discrepantes (Figura 9). Assim como para IMNV<sub>105-297</sub>, em IMNV<sub>300-527</sub> se identificou diferenças somente para a sequência da Indonésia ou para ambas sequências, não havendo aminoácidos únicos da sequência do Brasil. Os aminoácidos díspares para sequências do Brasil e da Indonésia localizam-se nas posições 356 e 515, onde os aminoácidos valina (V) e arginina (R) foram substituídos por isoleucina (I) e glicina (G), respectivamente. Os aminoácidos discrepantes apenas para a sequência da Indonésia se encontram nas posições 476 e 508, onde os dois aminoácidos valina (V) foram substituídos por ácido glutâmico (E) e isoleucina (I), respectivamente.

|                         |  |      |
|-------------------------|--|------|
|                         | 105  | 149  |
|                         |  |      |
| IMNV <sub>105-297</sub> | QLRLQGIETHITDSYISKAEPDSYSKQLSEMVNAQKTSTWRANNI  |      |
| IMNV Brasil             | QLRLQGIETHITDSYISKAEPDSYSKQLSEMVNAQKTSTWRANNI  |      |
| IMNV Indonésia          | QLRLQGIETHITDSYISKAEPDSYSKQLSEMVNAQKTSTWRANNI  |      |
|                         | 150  | 194  |
|                         |  |      |
| IMNV <sub>105-297</sub> | ASQGWDMFDTVQLNTNISQKDLSDMTALTCLMLLYQLTTQNLPAT  |      |
| IMNV Brasil             | ASQGWDMFDTVQLNTNISQKDLSDMTALTCLMLLYQLTTQNLPAT  |      |
| IMNV Indonésia          | ASQGWDMFDTVQLNTNISQKDLSDMTALTCLMLLYQLTTQNLPAT  |      |
|                         | 195  | 239  |
|                         |  |      |
| IMNV <sub>105-297</sub> | QLPSSIYSAFDSRTQPTLQDGIWGINNGNIFGEQCGGLAAPVFP   |      |
| IMNV Brasil             | QLPSSIYSAFDSRTQPTLQDGIWGINNGNIFGEQCGGLAAPVFP   |      |
| IMNV Indonésia          | QLPSSIYSAFDSRTQPTLQDGIWGINNGNIFGEQCGGLAAPVFP   |      |
|                         | 240  | 284  |
|                         |  |      |
| IMNV <sub>105-297</sub> | FSGGTGEITFHLTLQSVPEFQESAI FVPATALQA AKEGARTLAM |      |
| IMNV Brasil             | FSGGTGEITFHLTLQSVPEFQESAI FVPATALQA AKEGARTLAM |      |
| IMNV Indonésia          | FSGGTGEITFHLTLQSVPEFQESAI FVPATALQA AKEGARTLAM |      |
|                         | 285  | 297  |
|                         |  |      |
| IMNV <sub>105-297</sub> | YVLMFAEWF                                      | GMYT |
| IMNV Brasil             | YVLMFAEWF                                      | GMYT |
| IMNV Indonésia          | YVLMFAEWF                                      | GMYT |

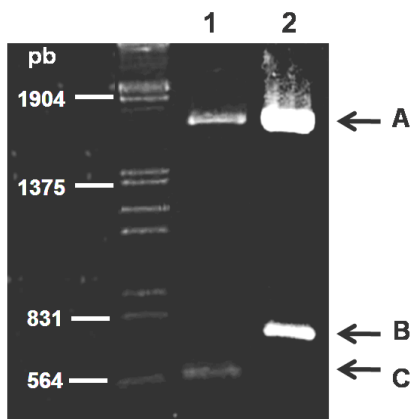
**Figura 8.** Alinhamento múltiplo da sequência aminoacídica deduzida de IMNV<sub>105-297</sub> com sequências homólogas da proteína do capsídeo de IMNV. Análise por Clustal W da localização de substituições não sinônimas de IMNV<sub>105-297</sub> por comparação com isolados virais do Brasil (*GenBank*: AY570982.1) e da Indonésia (*GenBank*: EF061744.1). Resíduo aminoacídico divergente para as sequências do Brasil e da Indonésia está destacado em preto; resíduo aminoacídico que diverge para a sequência da Indonésia está destacado em cinza.

|                |  |  |     |
|----------------|--|--|-----|
|                | 300  |  | 346 |
|                |  |  |     |
| IMNV 300-527   | TKQTTDNAGNNQSDQIFIHSESTVHIPGQKQMHIVLPRKVNVMVNPTT |  |     |
| IMNV Brasil    | TKQTTDNAGNNQSDQIFIHSESTVHIPGQKQMHIVLPRKVNVMVNPTT |  |     |
| IMNV Indonésia | TKQTTDNAGNNQSDQIFIHSESTVHIPGQKQMHIVLPRKVNVMVNPTT |  |     |
|                | 347  |  | 393 |
|                |  |  |     |
| IMNV 300-527   | IAEANARVVQPTYGTVAAGAGVANGNINVAAGVALPTVNLTDYLV    |  |     |
| IMNV Brasil    | IAEANARVVQPTYGTVAAGAGVANGNINVAAGVALPTVNLTDYLV    |  |     |
| IMNV Indonésia | IAEANARVVQPTYGTVAAGAGVANGNINVAAGVALPTVNLTDYLV    |  |     |
|                | 394  |  | 440 |
|                |  |  |     |
| IMNV 300-527   | SWATDFTLGDIKQLVERMKTTLPISRDLMAARQNAMLLSTLFPPLIQ  |  |     |
| IMNV Brasil    | SWATDFTLGDIKQLVERMKTTLPISRDLMAARQNAMLLSTLFPPLIQ  |  |     |
| IMNV Indonésia | SWATDFTLGDIKQLVERMKTTLPISRDLMAARQNAMLLSTLFPPLIQ  |  |     |
|                | 441  |  | 487 |
|                |  |  |     |
| IMNV 300-527   | SNVASDTKEVPGTAGAYTACLANLGIPETLTVNWGQDINVQPLYQLL  |  |     |
| IMNV Brasil    | SNVASDTKEVPGTAGAYTACLANLGIPETLTVNWGQDINVQPLYQLL  |  |     |
| IMNV Indonésia | SNVASDTKEVPGTAGAYTACLANLGIPETLTVNWGQDINVQPLYQLL  |  |     |
|                | 488  |  | 527 |
|                |  |  |     |
| IMNV 300-527   | ETDITAHNRYVLNLFKREEVWAGAYEFQWLGHMASYMMGL         |  |     |
| IMNV Brasil    | ETDITAHNRYVLNLFKREEVWAGAYEFQWLGHMASYMMGL         |  |     |
| IMNV Indonésia | ETDITAHNRYVLNLFKREEVWAGAYEFQWLGHMASYMMGL         |  |     |

**Figura 9.** Alinhamento múltiplo da sequência aminoacídica deduzida de IMNV<sub>300-527</sub> com sequências homólogas da proteína do capsídeo de IMNV. Análise por Clustal W da localização de substituições não sinônimas de IMNV<sub>300-527</sub> por comparação com isolados virais do Brasil (*GenBank*: AY570982.1) e da Indonésia (*GenBank*: EF061744.1). Resíduos aminoacídicos divergentes para as sequências do Brasil e da Indonésia estão destacados em preto; resíduos aminoacídicos que divergem para a sequência da Indonésia estão destacados em cinza.

#### 4.2. Expressão e caracterização de rIMNV<sub>105-297</sub> e rIMNV<sub>300-527</sub>

Após a confirmação da identidade das sequências nucleotídicas de IMNV<sub>105-297</sub> e IMNV<sub>300-527</sub>, os mesmos foram removidos dos plasmídeos de clonagem pela restrição com as enzimas *Bam*HI/*Nde*I e *Xho*I/*Bam*HI, respectivamente, e submetidos à eletroforese (Figura 10). Entretanto, a excisão dos fragmentos foi somente possível pela adição prévia das sequências-alvo dessas enzimas nas extremidades dos iniciadores construídos.

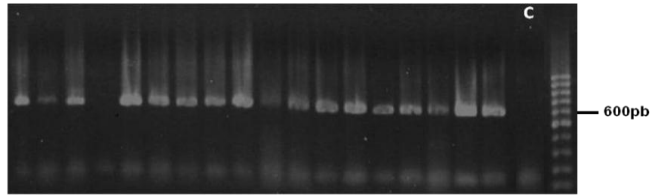


**Figura 10.** Produtos da digestão de vetores de clonagem contendo IMNV<sub>105-297</sub> ou IMNV<sub>300-527</sub>. Eletroforese em gel de agarose (1,0%) corado com brometo de etídio mostrando a digestão de pGEM T-easy-IMNV<sub>105-297</sub> com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Nde*I (1) e pGEM T-easy-IMNV<sub>300-527</sub> com as enzimas de restrição *Xho*I e *Bam*HI (2). A= plasmídeo pGEM T-easy; B= IMNV<sub>300-527</sub> (697 pb); C= IMNV<sub>105-297</sub> (598 pb).

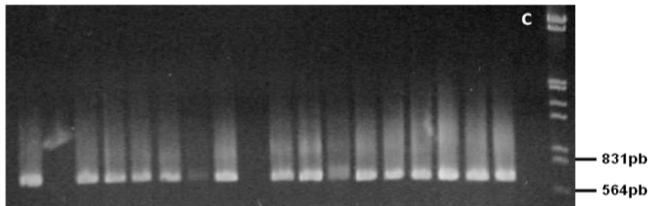
Para a realização da ligação de IMNV<sub>105-297</sub> ou IMNV<sub>300-527</sub> no vetor de expressão pET-14b, o plasmídeo de expressão foi também submetido ao tratamento com as respectivas enzimas de restrição, preparando-o para posterior ligação dos insertos. A clonagem utilizando duas enzimas de restrição distintas (clonagem unidirecional) confere ao plasmídeo extremidades não coesivas, diminuindo a probabilidade de um auto ligação do vetor de expressão, bem como impedindo a ligação do inserto em sentido contrário (SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Essa estratégia aumenta as chances de sucesso no processo de clonagem quando comparada a utilização de uma única enzima.

Após a construção dos plasmídeos de expressão pET-IMNV<sub>105-297</sub> e pET-IMNV<sub>300-527</sub>, bactérias competentes *E. coli* BL21(DE3) e DH5 $\alpha$  foram transformadas com os mesmos por eletroporação. A partir do crescimento de bactérias BL21(DE3) em meio LB sólido contendo ampicilina, colônias foram selecionadas e analisadas com o intuito de se confirmar a presença de plasmídeos com insertos por PCR, utilizando-se iniciadores específicos para IMNV<sub>105-297</sub> e IMNV<sub>300-527</sub> (Figura 11). As bactérias DH5 $\alpha$  transformadas também foram selecionadas por PCR para posterior extração de DNA plasmidial. pET-IMNV<sub>105-297</sub> e pET-IMNV<sub>300-527</sub> foram seqüenciados com iniciadores específicos para os seus insertos a fim de confirmar novamente suas identidades, bem como certificar que os mesmos se encontravam na fase de leitura correta para expressão (dados não mostrados).

A



B



**Figura 11.** Produtos de amplificação obtidos por PCR de colônias *E. coli* BL21 (DE3) transformadas com pET-IMNV<sub>105-297</sub> ou pET-IMNV<sub>300-527</sub>. As amplificações de IMNV<sub>105-297</sub> e IMNV<sub>300-527</sub> a partir de distintas colônias bacterianas que cresceram após transformação (uma colônia por poço), foram realizadas através de PCR utilizando-se iniciadores específicos para esses dois fragmentos da proteína do capsídeo do IMNV, cuja visualização foi realizada em géis de agarose 1% corados com brometo de etídio. **(A)** produtos de amplificação de 598 pb referentes a IMNV<sub>105-297</sub>; **(B)** produtos de amplificação de 697 pb referente a IMNV<sub>300-527</sub>. C= controle de reação sem adição de amostra.

A partir do sequenciamento de pET-IMNV<sub>105-297</sub> e pET-IMNV<sub>300-527</sub>, as sequências aminoacídicas deduzidas dos fragmentos gênicos IMNV<sub>105-297</sub> e IMNV<sub>300-527</sub> foram obtidas e os pesos moleculares esperados para suas respectivas proteínas recombinantes (rIMNV<sub>105-297</sub> e rIMNV<sub>300-527</sub>) foram identificados com auxílio do programa *ProtParam*. rIMNV<sub>105-297</sub> codifica uma proteína de 25,7 kDa com ponto isoeletrico 5,6; rIMNV<sub>300-527</sub>



codifica uma proteína de 29,67 kDa com ponto isoelétrico 7,2 (Quadro 2).

**Quadro 2.** Parâmetros bioquímicos deduzidos dos fragmentos protéicos rIMNV<sub>105-297</sub> e rIMNV<sub>300-527</sub>.

| Fragmentos proteicos     | Número de aminoácidos | Pesos moleculares | Ponto isoelétrico |
|--------------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|
| rIMNV <sub>105-297</sub> | 194 aa                | 25,7 kDa          | 5,6               |
| rIMNV <sub>300-527</sub> | 228 aa                | 29,67 kDa         | 7,2               |

Posteriormente, diversos testes de expressão foram realizados com o intuito de avaliar as melhores condições para produção em maior escala de rIMNV<sub>105-297</sub> e rIMNV<sub>300-527</sub>. A cepa da linhagem de *E. coli* BL21(DE3) apresenta diversas vantagens para a expressão de proteínas recombinantes, tais como: i) crescimento vigoroso em meios mínimos; ii) não patogênica; iii) ausência de proteases que interfiram na estabilidade das proteínas super expressas (CHART et al., 2000). Assim, bactérias BL21(DE3) contendo pET-IMNV<sub>105-297</sub> ou pET-IMNV<sub>300-527</sub> foram cultivadas em meio LB líquido contendo ampicilina e, após atingirem a fase de crescimento exponencial, identificada quando a turbidez do meio de cultivo atingiu densidade óptica entre 0,4 e 0,6 a 600 nm, adicionou-se 1 mM de IPTG para induzir a expressão dos fragmentos de interesse em diferentes condições de temperatura e tempos de cultivo. Para a expressão de rIMNV<sub>105-297</sub>, as bactérias foram cultivadas com IPTG por 1,5 h e 3 h a 37°C ou 3 h e 15 h a 27°C e 18°C; na expressão de rIMNV<sub>300-527</sub>, as condições de cultivo pós-indução foram 4h a 37°C ou 4 h e 12 h a 27°C e 18°C.

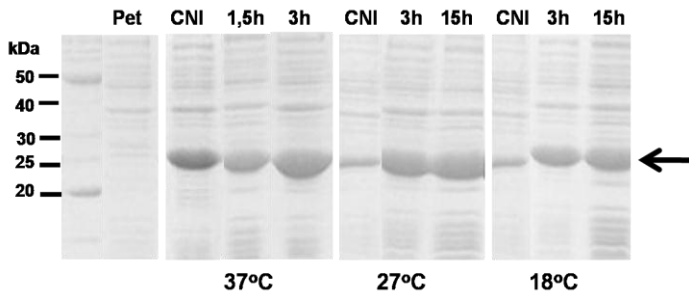
Tempos prolongados de indução a 37°C não foram realizados, pois, por ser a temperatura ótima de crescimento de *E. coli*, promoveria um intenso crescimento bacteriano que, por conseguinte, repercutiria em lise celular e liberação de proteases que degradariam as proteínas de interesse.

Em todas as condições avaliadas observou-se a expressão de rIMNV<sub>105-297</sub> ou rIMNV<sub>300-527</sub>, inclusive no extrato bacteriano coletado previamente à indução, denominado controle não-induzido (CNI) (Figura 12). O sistema de expressão de bactérias BL21(DE3) contendo plasmídeo pET-14b caracteriza-se pela ligação do IPTG ao promotor do gene que codifica uma RNA polimerase do bacteriófago T7 presente no genoma bacteriano. Após a ligação, a enzima é sintetizada e, por ter alta afinidade com o promotor desse plasmídeo, promoverá a expressão dos insertos contidos no mesmo (BANEYX, 1999; SORENSEN; MORTENSEN, 2005). Contudo, existe uma aparente expressão basal da enzima mesmo sem a presença do indutor, haja vista que rIMNV<sub>105-297</sub> e rIMNV<sub>300-527</sub> são expressas na ausência do mesmo. Bactérias BL21(DE3) não possuem plasmídeos que codificam repressores aos promotores do gene da RNA polimerase do bacteriófago T7, tal como o plasmídeo pLys, o que repercute numa menor regulação na expressão da enzima na ausência de indutor (BANEYX, 1999; SAMBROOK; RUSSEL, 2001). Por essa razão, as proteínas recombinantes apresentaram-se nos CNI nas diversas temperaturas analisadas, mas, contudo, a expressão foi mais expressiva após a indução.

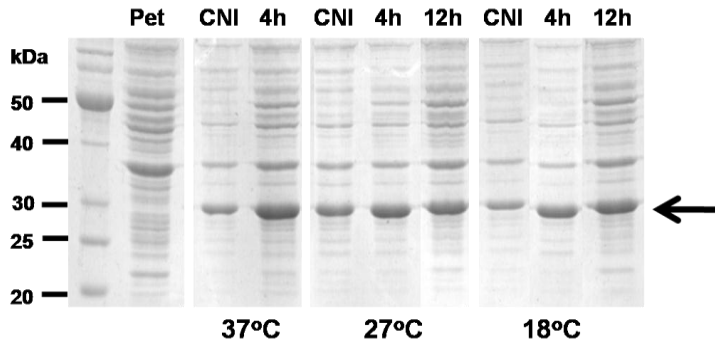
Dentre todas as condições analisadas, escolheram-se as condições de 15h de crescimento a 27°C para rIMNV<sub>105-297</sub> e de 4h a 37°C para rIMNV<sub>300-527</sub>. Essas condições foram escolhidas, pois, apesar de se aplicar no gel uma concentração similar de bactérias e de não ter havido diferença significativa entre as condições analisadas, nelas o volume do precipitado celular foi maior

e, portanto, concluiu-se que se obteria uma concentração mais elevada de proteínas recombinantes.

**A**



**B**

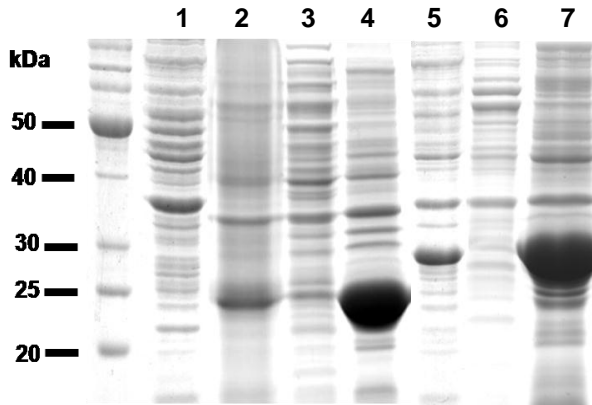


**Figura 12.** Padrões de expressão proteica de rIMNV<sub>105-297</sub> e rIMNV<sub>300-527</sub> sob diferentes condições de temperatura e tempos de cultivo. Bactérias *E. coli* BL21(DE3) transformadas com os plasmídeos pET-IMNV<sub>105-297</sub> ou pET-IMNV<sub>300-527</sub> foram cultivadas em meio LB líquido contendo ampicilina e induzidas à expressão com 1 mM de IPTG sob diferentes temperaturas (37°C, 27°C ou 18°C) e tempos de cultivo pós-indução (1,5h, 3h, 4h, 12h ou 15h). Fechas indicam a expressão majoritária de bandas de ~ 25 kDa e ~ 30 kDa que correspondem aos tamanhos esperados de rIMNV<sub>105-297</sub> (A) e rIMNV<sub>300-</sub>

<sup>527</sup> (B), respectivamente. Pet= *E. coli* BL21(DE3) transformada com plasmídeo pET-14b sem inserto; CNI= controle não-induzido - *E. coli* transformada com os plasmídeos pET-IMNV<sub>105-297</sub> ou pET-IMNV<sub>300-527</sub> antes da indução por IPTG.

A fim de se avaliar a solubilidade das proteínas expressas, o precipitado de bactérias expressando rIMNV<sub>105-297</sub> e rIMNV<sub>300-527</sub> foi sonicado e as frações solúveis e insolúveis foram separadas por centrifugação. A obtenção de proteínas solúveis expressas em bactérias é bastante rara, sendo corriqueira a agregação de proteínas super expressas no citoplasma das bactérias, formando os chamados corpos de inclusão (VILLAVERDE; CARRIO, 2003). A formação desses agregados insolúveis de proteínas depende de uma série de fatores, tais como: i) a natureza intrínseca da proteína recombinante; ii) taxa de expressão proteica; iii) concentração celular de intermediários da proteína que proporcionam um enovelamento incompleto; iv) composição e o pH do meio de cultivo; v) temperatura de crescimento e a localização celular da proteína expressa (HOCKNEY, 1994; MARCO et al., 2005).

Ao se fazer a escolha dos fragmentos gênicos IMNV<sub>105-297</sub> e IMNV<sub>300-527</sub>, primeiramente se verificou o grau de hidrofiliidade de suas sequências aminoacídicas deduzidas com o auxílio do programa ProtScale. As razões para a escolha dessa característica bioquímica são duas: i) regiões hidrofílicas são potencialmente expostas na superfície da partícula viral cujo reconhecimento por AcMo seria facilitado em testes de diagnóstico; ii) reduzem-se as chances de formação de corpos de inclusão. Não obstante ao esforço de se sintetizar proteínas solúveis, uma vez que facilitaria o processo de purificação, rIMNV<sub>105-297</sub> e rIMNV<sub>300-527</sub> encontram-se nas frações insolúveis dos lisados bacterianos (Figura 13).



**Figura 13.** Avaliação da solubilidade das proteínas recombinantes rIMNV<sub>105-297</sub> e rIMNV<sub>300-527</sub> expressas em sistema procariótico. SDS-PAGE 12 % corado com Coomassie blue demonstrando o perfil proteico de *E. coli* BL21(DE3) expressando as proteínas recombinantes após separação das porções solúvel e insolúvel da cultura bacteriana. 1= *E. coli* com plasmídeo pET-14b sem inserto, 2= *E. coli* transformada com pET-IMNV<sub>105-297</sub> e induzida com IPTG por 4h a 27°C, 3= fração solúvel e 4= fração insolúvel de *E. coli* expressando rIMNV<sub>105-297</sub>; 5= *E. coli* transformada com pET-IMNV<sub>300-527</sub> e induzida com IPTG por 4h a 37°C; 6= fração solúvel e 7= fração insolúvel de *E. coli* expressando rIMNV<sub>300-527</sub>.

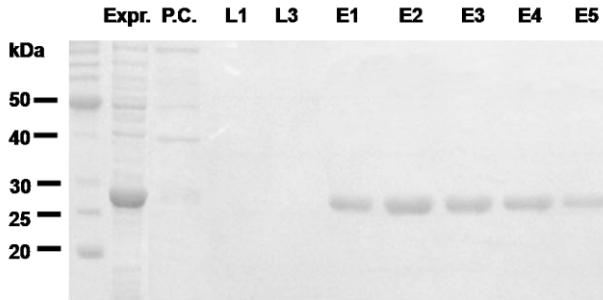
Para fazer a dissociação dos corpos de inclusão formados nas expressões de rIMNV<sub>105-297</sub> e rIMNV<sub>300-527</sub>, fez-se um tratamento desnaturante com uréia. A desnaturação das proteínas deve-se, principalmente, a necessidade de expor a cauda de poli-histidina presentes na porção N-terminal das proteínas recombinantes. Essa cauda provém do vetor pET-14b e é utilizada para identificação de proteínas recombinantes, uma vez que anticorpos específicos podem reconhecê-la e, então, determinar a identidade das proteínas de interesse. Além disso, a cauda de poli-histidina é amplamente utilizada

como estratégia para facilitar a purificação das proteínas de interesse utilizando a técnica de cromatografia de afinidade com íons metálicos imobilizados ( $\text{Ni}^{2+}$ ) (LUCAST; BATEY; DOUDNA, 2001; ESHAGHI et al., 2005).

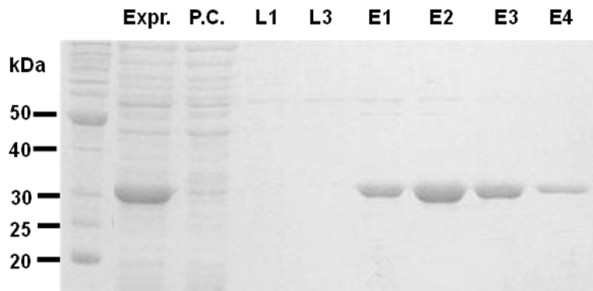
Neste trabalho, foi possível obter frações purificadas das proteínas rIMNV<sub>105-297</sub> e rIMNV<sub>300-527</sub> purificadas ligando-as a  $\text{Ni}^{+2}$  imobilizado em resina de agarose e, posteriormente, eluindo-as com tampão redutor (pH 4,5). Bandas majoritárias de pesos moleculares de ~ 25 kDa e ~ 30 kDa foram obtidas nas eluições, correspondendo a rIMNV<sub>105-297</sub> e rIMNV<sub>300-527</sub>, respectivamente (Figura 14). Uma quantidade expressiva de rIMNV<sub>105-297</sub> foi obtida até a quinta eluição (E5); rIMNV<sub>300-527</sub> apenas até a quarta eluição. A eficiência de ligação das proteínas recombinantes pode ser observada no extrato protéico coletado após passagem pela coluna (P.C.), haja vista que não há a visualização de bandas de tamanhos esperados para as proteínas recombinantes.

Após a purificação, averiguou-se a identidade das proteínas recombinantes por Western-blot utilizando anticorpo primário antipoli-histina (Figura 15). Observou-se o reconhecimento de uma banda única tanto no lisado bacteriano expressando rIMNV<sub>105-297</sub> ou rIMNV<sub>300-527</sub> quanto nas proteínas purificadas e, após a certificação da correta purificação das proteínas, essas foram utilizadas na imunização de camundongos. No entanto, devido ao processo de desnaturação realizado previamente, diálises foram realizadas com o intuito de renaturar e enovelar as proteínas, permitindo a retirada da uréia e retorno ao pH ideal. Somente após esse procedimento, rIMNV<sub>105-297</sub> e rIMNV<sub>300-527</sub> foram utilizados como imunógenos.

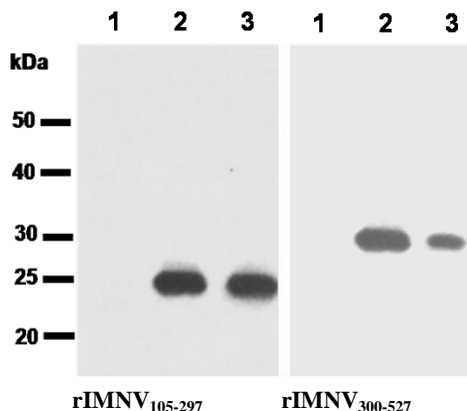
A



B



**Figura 14.** Padrão de purificação de rIMNV<sub>105-297</sub> e rIMNV<sub>300-527</sub> por coluna de afinidade contendo níquel. SDS-PAGE 12% contendo amostras de cada etapa do processo da purificação de rIMNV<sub>105-297</sub> (**A**) e rIMNV<sub>300-527</sub> (**B**). Expr.= lisado de proteína de bactérias BL21(DE3) expressando as proteínas recombinantes; P.C.= fração proteica que não se aderiu à resina de purificação; L1= primeira lavagem; L3= terceira lavagem; E1= primeira eluição; E2= segunda eluição; E3= terceira eluição; E4= quarta eluição; E5= quinta eluição.



**Figura 15.** Avaliação da expressão e purificação de rIMNV<sub>105-297</sub> e rIMNV<sub>300-527</sub> por Western-blot. Após o lisado de bactérias expressando os fragmentos proteicos e as proteínas purificadas serem separadas em SDS-PAGE 12%, essas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e incubadas com anticorpos antipoli-histidina. 1= *E. coli* com plasmídeo pET-14b sem inserto; 2= *E. coli* transformadas com pET-IMNV<sub>105-297</sub> ou pET-IMNV<sub>300-527</sub> induzidas com IPTG por 4h a 37°C; 3= proteínas recombinantes purificadas.

#### 4.3. Produção e caracterização de anticorpos monoclonais contra rIMNV<sub>105-297</sub> e rIMNV<sub>300-527</sub>

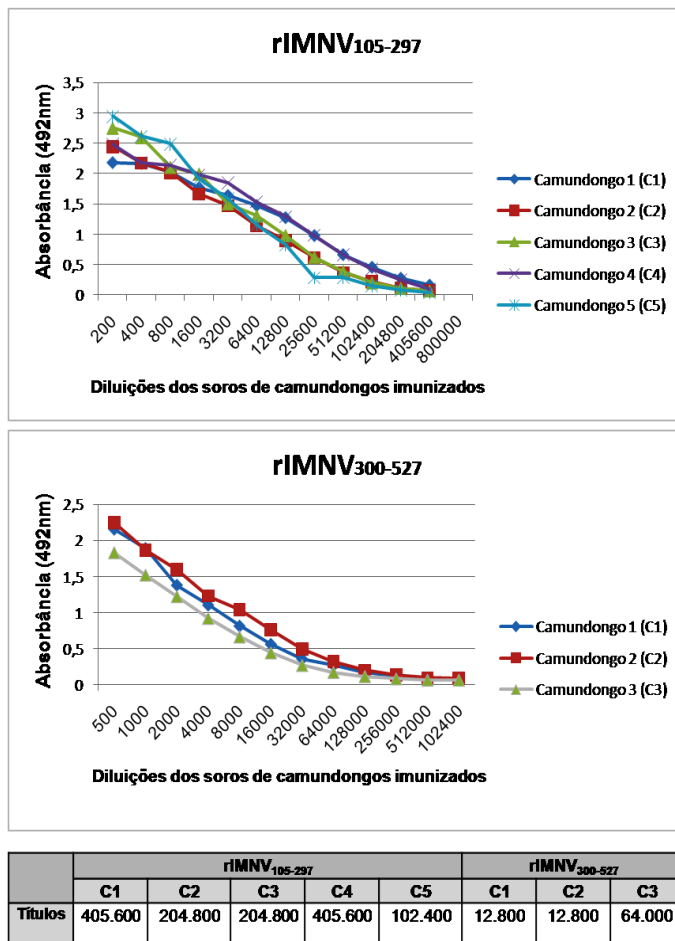
Com o intuito de se obter linhagem celulares capazes de crescer *in vitro* e produzir anticorpos monoclonais contra a proteína do capsídeo do IMNV, camundongos da linhagem BALB/c foram imunizados com rIMNV<sub>105-297</sub> ou rIMNV<sub>300-527</sub>.

A produção de AcMo requer a otimização de diversas etapas, dentre essas a escolha do protocolo de imunização utilizado. Por conseguinte, os animais receberam quatro doses contendo 50 µg de rIMNV<sub>105-297</sub> ou rIMNV<sub>300-527</sub>, sendo a primeira e a segunda doses administradas pela via subcutânea com a presença de



adjuvante completo ou incompleto de Freund, respectivamente. Adjuvantes auxiliam na indução da resposta imunológica, uma vez que são reconhecidos por componentes da resposta inata que, posteriormente, ativarão linfócitos da resposta adaptativa (STILLS, 2005). Ambos adjuvantes completo e incompleto de Freund são compostos por óleo mineral, mas somente o completo apresenta fragmentos de parede celular de *Mycobacterium* na sua formulação. Assim sendo, esses adjuvantes auxiliam na indução da resposta imune por três mecanismos: i) liberação lenta do antígeno de interesse; ii) veiculação do transporte do antígeno pelo sistema linfático às células imunoefetoras; iii) interação com células apresentadoras de antígeno, como macrófagos e células dendríticas.

Posterior as duas doses por via subcutânea, duas doses foram administradas pela via intraperitoneal sem a presença de adjuvante, haja vista que a utilização de adjuvantes por essa via induz uma forte resposta inflamatória no local da inoculação, levando ao desenvolvimento de peritonites ou diversas injúrias ao animal. Cinco dias após a terceira dose, os animais imunizados foram sangrados pelo plexo retroorbital a fim de se titular os nível de anticorpos séricos contra rIMNV<sub>105-297</sub> ou rIMNV<sub>300-527</sub>, bem como selecionar os animais que receberiam a última dose para, então, serem sacrificados no procedimento de fusão. Para tanto, realizou-se um ELISA indireto no qual as proteínas recombinantes foram utilizadas como antígenos de sensibilização. Dentre os cinco camundongos que foram imunizados com rIMNV<sub>105-297</sub>, os camundongos 1 e 4 apresentaram maiores títulos – acima de 400.000 – e, portanto, receberam a última dose (Figura 16). Em contrapartida, os três camundongos imunizados com rIMNV<sub>300-527</sub> apresentaram títulos entre 12.800 e 64.000 (Figura 16) e todos receberam a quarta dose.



**Figura 16.** Titulação dos anticorpos séricos de camundongos imunizados com rIMNV<sub>105-297</sub> ou rIMNV<sub>300-527</sub> por ELISA indireto. O título de anticorpos de cada camundongo imunizado foi definido pela diluição que apresentou absorbância três vezes superior ao controle com soro de camundongo não-imunizado.

A extração dos baços dos animais que receberam a quarta dose ocorreu quatro dias após a última dose. O período para retirada do baço após o último reforço é um fator determinante para obtenção de hibridomas secretores de anticorpo de interesse (CIANFRIGLIA et al., 2006). Se o baço for coletado precoce ou tardiamente, a frequência de células B antígeno-específico pode ser baixa, diminuindo a geração de hibridomas produtores de anticorpos de interesse (YOKOYAMA et al., 2006).

No processo de fusão de células de mieloma com esplenócitos provenientes dos baços de animais imunizados com rIMNV<sub>105-297</sub>, cinco placas de 96 cavidades foram geradas. Dessas placas, verificou-se que 45,63% dos poços apresentaram crescimento de hibridomas e, após triagem por ELISA indireto, 8,2% dos hibridomas eram secretores de anticorpos contra rIMNV<sub>105-297</sub> (Tabela 1). Em contrapartida, a fusão de esplenócitos provenientes de camundongos imunizados com rIMNV<sub>300-527</sub> resultou em 12 placas de 96 cavidades que apresentaram crescimento de hibridomas em 79% poços, onde 3,3% deles secretavam anticorpos específicos contra rIMNV<sub>300-527</sub> (Tabela 1).

**Tabela 1.** Relação de hibridomas obtidos nas fusões de mielomas com esplenócitos provenientes de camundongos imunizados com IMNV<sub>105-297</sub> ou IMNV<sub>300-527</sub>.

| Antígenos               | Número de camundongos | Número de placas de 96 poços geradas | Número de poços com crescimento de hibridomas | Número de clones positivos | Número de clones monoclonais |
|-------------------------|-----------------------|--------------------------------------|---|----------------------------|------------------------------|
| IMNV <sub>105-297</sub> | 2                     | 5                                    | 219 (45,63%)                                  | 18 (8,2%)                  | 6                            |
| IMNV <sub>300-527</sub> | 3                     | 12                                   | 910 (79%)                                     | 30 (3,3%)                  | 10                           |

Segundo Yokoyama e colaboradores (2006), geralmente mais de 50% dos poços obtidos após a fusão apresentam crescimento de hibridomas, sendo que desses apenas de 1 a 5% secretam anticorpos de interesse. O percentual de poços que apresentaram crescimento de hibridomas gerados na fusão de rIMNV<sub>300-527</sub> foi de 79%, um valor mais elevado do que a média esperada. Normalmente, um número elevado de hibridomas pode estar vinculado a um período de maior exposição ao polietilenoglicol (PEG) do que o recomendado. No entanto, sabe-se que as células expostas ao PEG por um tempo prolongado podem sofrer injúrias ou morrer (BARTAL; HIRSHAUT, 1987). Assim, visto que o percentual de clones secretores de anticorpos permaneceu na média esperada (3,3%), talvez esse não tenha sido o fator determinante para o maior crescimento de hibridomas.

O percentual de hibridomas secretores de anticorpos contra rIMNV<sub>105-297</sub> ou rIMNV<sub>300-527</sub> foi de 8,2% e 3,3%, respectivamente. Sabe-se que o genoma da célula híbrida é instável e que alguns cromossomos são perdidos nos primeiros dias após a fusão (KÖHLER; MILSTEIN, 1975; ZOLA, 1987). Essa perda pode incluir cromossomos envolvidos na síntese e secreção de imunoglobulinas (ZOLA, 1987) ou na produção das enzimas hipoxantina-guanina fosforibosil transferase e timidina quinase envolvidas no processo de seleção dos hibridomas, tornando os hibridomas inaptos a sobreviverem ao cultivo em meio contendo aminopterina (TAGGART; SAMLOFF, 1983). Entretanto, apesar de toda instabilidade do processo de rearranjo gênico e de seleção dos hibridomas, foram obtidos 18 e 30 clones secretores de anticorpos contra rIMNV<sub>105-297</sub> e rIMNV<sub>300-527</sub>, respectivamente.

Esses clones foram submetidos à expansão celular e congelamento, haja vista que o cultivo de hibridomas *in vitro* por tempo prolongado pode resultar na perda da

produção de anticorpos (BARNES; BENTLEY; DICKSON, 2003). Além disso, alguns hibridomas podem crescer mais aceleradamente em detrimento de outros. Frequentemente, essas células em rápida expansão não sintetizam anticorpos, resultando na perda dos hibridomas desejados (ZOLA, 1987). Por isso, do total de 18 clones para rIMNV<sub>105-297</sub>, seis foram subclonados por diluições limitantes a fim de torná-los monoclonais; para rIMNV<sub>300-527</sub>, 10 de 30 clones passaram pelo mesmo procedimento (Tabela 1).

A caracterização dos AcMo quanto aos seus isotipos permitiu identificar a predominância de IgM dentre os AcMo anti-rIMNV<sub>105-297</sub>, onde apenas os AcMo 1.3H e 4.6C são IgG de subclasse  $\gamma 1$  (Tabela 2). Dentre os AcMo anti-rIMNV<sub>300-527</sub> houve uma maior prevalência de AcMo de classe IgG, especialmente os de subclasses  $\gamma 2a$  e  $\gamma 2b$  (Tabela 2). Estudos relacionados à produção de AcMo contra outros vírus de camarões - tais como IHNV, WSSV, TSV e YHV - também encontraram uma prevalência maior de imunoglobulinas de classe IgG, subclasses  $\gamma 1$  ou  $\gamma 2$  (SITHIGORNGUL et al., 2000; POULOS et al., 2001; ANIL et al., 2002; ERICKSON; ZARAINHERZBERG; LIGHTNER, 2002; LIU et al., 2002; WANG et al., 2008). Sithigornkul e colaboradores (2000) identificaram resultados falso-positivos quando anticorpos IgM foram testados frente a tecidos de camarões não-infectados. Em contrapartida, anticorpos IgG apresentam a vantagem de possuírem maior afinidade e especificidade, além de menor ocorrência de reações cruzadas em imunoenaios (LIGHTNER; REDMAN, 1998).

Após a identificação dos isotipos, almejou-se avaliar a sensibilidade da reatividade dos AcMo gerados frente a diferentes concentrações de rIMNV<sub>105-297</sub> ou rIMNV<sub>300-527</sub> por ELISA indireto e por imunodot-blot (Tabela 2). Os ensaios com AcMo anti-rIMNV<sub>105-297</sub> realizados por ELISA demonstraram maior sensibilidade

dessa técnica, uma vez que a reatividade pôde ser detectada com concentrações de proteína de 0,05 a 6,25 ng por ELISA e de 0,45 a 6,25 ng por imunodot-blot. Entretanto, os resultados obtidos com os AcMo anti-rIMNV<sub>300-527</sub> demonstraram maior sensibilidade nos ensaios realizados por imunodot-blot, cujas reatividades variaram entre 1,56 - 6,25 ng por ELISA e 0,1-0,45 ng por imunodot-blot. Esses resultados demonstram uma diversidade de sensibilidades dos AcMo nas técnicas utilizadas. Essas diferenças podem, ou não, estar associadas à característica intrínseca dos anticorpos quanto a sua afinidade pelo epítipo. Contudo, salienta-se que as discrepâncias podem também estar associadas às características dos hibridomas secretores dos AcMo, visto que esses apresentam distinções no que tange a velocidade de crescimento e potencial de secreção de anticorpos.

Dados da literatura que avaliam a sensibilidade de AcMo por imunodot-blot reportam valores similares aos identificados para os AcMo anti-rIMNV<sub>105-297</sub> e anti-rIMNV<sub>300-527</sub>. Esses estudos demonstram que AcMo gerados contra proteínas de outros vírus de camarão - tais como IHNNV, WSSV e TSV - são passíveis de detectar seus antígenos em concentrações entre 70 e 800 pg (LIU et al., 2002; ANIL et al., 2003; LONGYANT et al., 2008b; SITHIGORNGUL et al., 2009; CHAIVISUTHANGKURA et al., 2010 a,b).

Os AcMo anti-rIMNV<sub>105-297</sub> 1.1D e 3.3G e o AcMo anti-rIMNV<sub>300-527</sub> 2.9C apresentaram reatividade contra as suas respectivas proteínas recombinantes até a última concentração analisada nos teste por ELISA (50 pg). Porém, não houve queda na reatividade desses anticorpos conforme decréscimo da concentração de antígeno. As razões que justifiquem esses resultados ainda são desconhecidas, no entanto, esses AcMo foram isotipados como IgM, podendo ser uma característica intrínseca desse isotipo de imunoglobulina como a sua maior prevalência de ligação inespecífica, uma vez que

usualmente IgM apresentam menor afinidade que IgG (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2002).

Os AcMo anti-rIMNV<sub>105-297</sub> 3.9G e anti-rIMNV<sub>300-527</sub> 2.9C não apresentaram reatividade contra a proteína recombinante em ensaios de imunodot-blot. Uma vez que essa técnica foi utilizada em análises subsequentes com tecido de camarão infectado, ambos os anticorpos foram descartados do estudo. A técnica de imunodot-blot foi escolhida, pois, embora tenha se mostrado mais sensível apenas com AcMo anti-rIMNV<sub>300-527</sub>, caracteriza-se por ser menos laboriosa e mais facilmente padronizável para a realização dos primeiros ensaios com tecido infectado com IMNV.

**Tabela 2.** Isotipos dos anticorpos monoclonais contra rIMNV<sub>105-297</sub> e rIMNV<sub>300-527</sub> e avaliação da reatividade frente tecido de camarão infectado por IMNV.

| Anticorpos monoclonais | Isotipos | rIMNV <sub>105-297</sub> ou rIMNV <sub>300-527</sub> |                          | Tecido de camarão infectado por IMNV |              |                   |      |
|------------------------|----------|--|--------------------------|--------------------------------------|--------------|-------------------|------|
|                        |          | ELISA (ng/poço)                                      | Imunodot-blot (ng/ponto) | Imunodot-blot (ng/ponto)             | Western-blot | Imunohistoquímica |      |
| A                      | 1.1D     | IgM  | ~ 0,05*                  | ~ 6,25                               | -            | -                 | N.D. |
| B                      | 1.3H     | IgG1   | ~ 0,05                   | ~ 0,72                               | ~ 8,5        | +                 | +    |
| C                      | 3.3G     | IgM  | ~ 0,05*                  | ~ 6,25                               | ~ 28,0       | -                 | -    |
| D                      | 3.9G     | IgM  | N.D.                     | -                                    | N.D.         | N.D.              | N.D. |
| E                      | 4.6C     | IgG1   | ~ 0,05                   | ~ 0,45                               | ~ 8,5        | +                 | +    |
| F                      | 5.4H     | IgM  | ~6,25                    | ~ 6,25                               | ~ 28,0       | +                 | + ** |
| G                      | 1.3G     | IgG2a  | ~ 1,56                   | ~ 0,38                               | ~ 5,0        | +                 | + ** |
| H                      | 1.3H     | IgG2a  | ~ 3,13                   | ~ 0,15                               | ~ 5,0        | - **              | N.D. |
| I                      | 1.8C     | IgG2b  | ~ 1,56                   | ~ 0,1                                | ~ 10,0       | +                 | +    |
| J                      | 2.9C     | IgM  | ~ 0,05 *                 | -                                    | N.D.         | N.D.              | N.D. |
| L                      | 2.9E     | IgG2b  | ~ 1,56                   | ~ 0,1                                | ~ 22,5       | +                 | +    |
| M                      | 3.3A     | IgG1   | ~ 1,56                   | ~ 0,23                               | ~ 115        | +                 | +    |
| N                      | 9.7F     | IgG2b  | ~ 1,56                   | ~ 0,12                               | -            | - **              | N.D. |
| O                      | 9.8D     | IgG2a  | ~ 3,13                   | ~ 0,23                               | ~ 22,5       | + **              | + ** |
| P                      | 9.8H     | IgG2b  | ~ 1,56                   | ~ 0,45                               | ~ 7,5        | - **              | N.D. |
| Q                      | 11.2D    | IgG2a  | ~ 6,25                   | ~ 0,23                               | ~ 255        | +                 | +    |

**A-F** = AcMo anti-rIMNV<sub>105-297</sub>; **G-Q** = AcMo anti-rIMNV<sub>300-527</sub>; **N.D.** = não determinado.

\* absorbância não decresceu mediante redução da concentração de antígeno; \*\* reatividade contra tecido de camarão não-infectado.

Linhas acinzentadas identificam os AcMo que apresentam especificidade contra tecido infectado em todos os ensaios realizados.



#### **4.4. Detecção de IMNV por AcMo anti-rIMNV<sub>105-297</sub> e anti-rIMNV<sub>300-527</sub> em tecidos de camarões naturalmente infectados**

Com o intuito de verificar a propriedade dos AcMo de reconhecer especificamente a proteína do capsídeo do IMNV, ensaios de imunodot-blot e Western-blot foram realizados com lisado de músculo esquelético do último segmento abdominal de camarões *L. vannamei*. Os camarões utilizados para essa triagem foram obtidos de fazendas da Parnaíba, Piauí, no ano de 2009. Apesar de seus sinais clínicos serem brandos, ensaios de RT-PCR confirmaram a ocorrência de infecção por IMNV (dados não mostrados).

Não obstante a presuntiva baixa concentração de vírus nesses camarões, ensaios de reatividade dos anticorpos frente a diferentes concentrações de proteínas totais do lisado comprovaram a eficácia desses anticorpos em detectar pequenas concentrações de proteínas virais por imunodot-blot (Tabela 2). Excetuando os AcMo anti-rIMNV<sub>105-297</sub> 1.1D e anti-rIMNV<sub>300-527</sub> 9.7F que não apresentaram reatividade contra os lisados infectado e não-infectado, os demais AcMo apresentaram reatividade contra o lisado infectado nos ensaios de imunodot-blot. AcMo anti-rIMNV<sub>105-297</sub> apresentaram reatividade variando entre 8,5-28 ng de proteínas totais do lisado de tecido de camarão infectado (Tabela 2, A-F); AcMo anti-rIMNV<sub>300-527</sub> apresentaram sensibilidade de detecção entre 5 e 255 ng (Tabela 2, G-Q).

Nos trabalhos publicados por Chaivisuthangkura e colaboradores (2010 a,b), avaliou-se a sensibilidade de AcMo contra TSV e WSSV por imunodot-blot frente a lisado de camarão infectado. Verificou-se que os anticorpos reagem com antígeno quando esse foi diluído até 40 ou 200 vezes. No entanto, esses trabalhos não fornecem valores da quantificação proteica do lisado, não permitindo uma análise comparativa com os resultados aqui obtidos. Contudo, esses dois trabalhos também verificaram que a combinação de anticorpos pode aumentar de duas a cinco vezes a sensibilidade de detecção do teste, sendo

uma promissora alternativa para futuros imunoenaios a serem padronizados com os anticorpos produzidos no presente trabalho.

Os ensaios de imunodot-blot permitiram confirmar a reatividade de muitos anticorpos frente ao lisado de camarão infectado com IMNV, bem como demonstrar a falta de reconhecimento de proteínas do lisado de camarão não-infectado. Entretanto, a simples avaliação da reatividade dos anticorpos contra tecido de camarão infectado por imunodot-blot não é o bastante para confirmar a especificidade dos mesmos contra proteínas virais.

Sabe-se que o perfil de expressão proteica dos tecidos pode alterar conforme a salubridade do animal, haja vista que diversos mediadores imunológicos são sintetizados para modular uma resposta antiviral em casos de infecção (LIU; SÖDERHÅLL; JIRAVANICHPAISAL, 2009). Costa e colaboradores (2009) avaliaram os parâmetros imunológicos de camarões infectados por IMNV e identificaram alterações na taxa de apoptose celular, na produção de ânions superóxidos, nos títulos de aglutinação e na atividade antimicrobiana. Esses dados evidenciam as mudanças metabólicas que ocorrem nos tecidos de camarão infectado por IMNV. Corroborando com esses resultados, pode-se observar que os perfis proteico de tecidos de camarões infectados ou não-infectados são qualitativos e quantitativamente distintos (Figura 17).

Assim, com o intuito de avaliar se os anticorpos se ligam à proteína de ~ 100 kDa do capsídeo do IMNV e que os mesmos não reagiram com proteínas que estão diferencialmente expressas nos tecidos infectados, ensaios de Western-blot em condições desnaturante e redutoras foram realizados. O panorama de reatividade dos AcMo por Western-blot pode ser visualizado na figura 17, cujos resultados estão sumarizados na tabela 2. Observou-se que os AcMo anti-rIMNV<sub>105-297</sub> 1.3H, 4.6C e 5.4H apresentaram reatividade contra a proteína de ~ 100 kDa do lisado de tecido de camarão infectado, bem como os AcMo anti-rIMNV<sub>300-527</sub> 1.3G, 1.8C, 2.9E, 3.3A e 11.2D (Figura 17). Esses

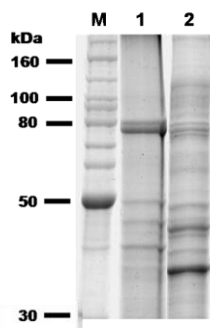
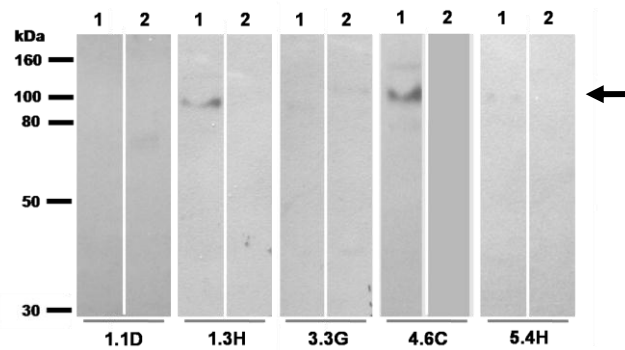
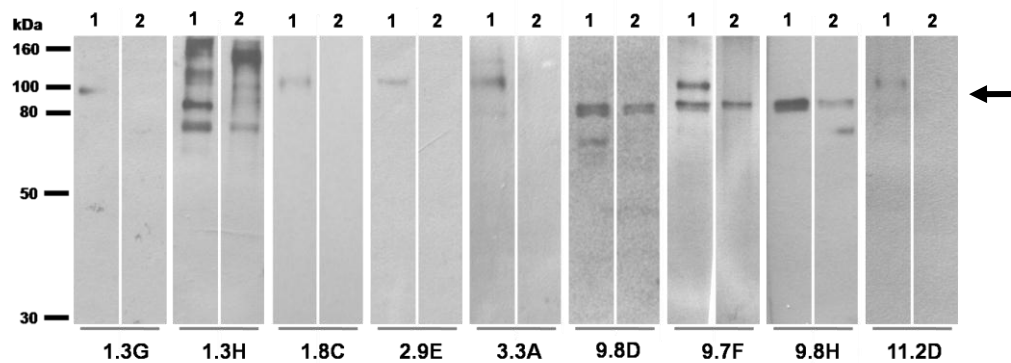
dados condizem com os resultados de imunodot-blot, uma vez que todos esses AcMo haviam apresentado reatividade apenas com tecido infectado. Dentre esses anticorpos, os AcMo anti-rIMNV<sub>105-297</sub> 1.3H e 4.6C e anti-rIMNV<sub>300-527</sub> 3.3A foram os únicos que reconheceram uma proteína com peso molecular acima de 100 kDa, tratando-se, provavelmente, da proteína do capsídeo do IMNV fusionada com a RNA polimerase dependente de RNA. Análises do genoma do IMNV já haviam previsto uma possível tradução conjunta das ORF-1 e ORF-2, gerando uma poliproteína que é posteriormente clivada para formar a proteína do capsídeo viral (NIBERT, 2007; TANG et al., 2008).

O AcMo anti-rIMNV<sub>105-297</sub> 3.3G não apresentou reatividade contra nenhum dos lisados por Western-blot, apesar de ter se mostrado positivo no imunodot-blot. Nesse caso é possível que alterações conformacionais decorrentes da eletroforese em condições desnaturantes tenham alterado o epítipo de reconhecimento do anticorpo. Assim, não foi possível confirmar se esse AcMo se liga especificamente ao vírus ou não, requerendo a realização de outras técnicas para avaliar essa questão.

O AcMo anti-rIMNV<sub>300-527</sub> 1.3H, que não havia demonstrado reatividade contra lisado de camarão não-infectado pela técnica de imunodot-blot, ligou-se inespecificamente a diversas proteínas dos lisados infectado e não-infectado nos ensaios de Western-blot. Em contrapartida, o AcMo anti-rIMNV<sub>105-297</sub> 1.1D reagiu com os lisados infectado e não-infectado em ambos testes de diagnóstico. Apesar do AcMo anti-rIMNV<sub>300-527</sub> 9.7F não ter apresentado reatividade nos testes por imunodot-blot, ele se ligou a uma proteína de ~ 80 kDa presente tanto no lisado de tecido de camarão infectado quanto no lisado preparado a partir de tecido de camarão não-infectado. Essas proteínas também foram reconhecidas pelo AcMo anti-rIMNV<sub>300-527</sub> 9.8D, embora esse também tenha reconhecido a proteína viral de ~ 100 kDa.

---

**Figura 17.** Detecção por Western-blot da proteína nativa do capsídeo de IMNV utilizando-se AcMo anti-IMNV. SDS-PAGE 12 % corado com Coomassie blue (**A**) e Western-blot do mesmo gel incubado com AcMo rIMNV<sub>105-297</sub> (**B**) e AcMo anti-rIMNV<sub>300-527</sub>. 1= lisado de músculo esquelético abdominal de camarão infectado com IMNV; 2= lisado de músculo esquelético abdominal de camarão não-infectado.

**A****B****C**

Diante desses resultados, conclui-se que a técnica de Western-blot confere resultados mais confiáveis que os determinados por imunodot-blot. Apesar do imunodot-blot ser uma técnica menos laboriosa e, por isso, é mais facilmente aplicável nos diagnósticos de rotina, ele revelou resultados falso-positivos para os AcMo anti-rIMNV<sub>300-527</sub> 1.3H, 9.8D e 9.8H. Entretanto, resultados falso-negativos não foram obtidos nas análises por imunodot-blot, como evidenciado, por exemplo, com o AcMo anti-rIMNV<sub>105-297</sub> 1.1D, que demonstrou ausência de reatividade por imunodot-blot e Western-blot. Assim, conclui-se que ensaios de imunodot-blot podem ser aplicados somente como primeiro método de triagem de camarões possivelmente infectados por IMNV, requerendo uma posterior confirmação por Western-blot.

Todos os testes de Western-blot foram realizados utilizando-se rIMNV<sub>105-297</sub> ou rIMNV<sub>300-527</sub> como controles positivos da reação (dados não mostrados). Alguns anticorpos apresentam ligação com uma ou duas bandas da amostra de proteínas recombinantes purificadas. A banda de maior peso molecular está possivelmente relacionada com a formação de dímeros dessas proteínas, que comumente ocorre após longos períodos de armazenamento. Assim, é possível que o fato de alguns anticorpos se ligarem em uma ou duas bandas dependa da variação entre amostras ou períodos que esses ensaios foram realizados.

Além dos ensaios de imunodot-blot e Western-blot, também se avaliou a capacidade dos AcMo detectarem o IMNV em tecidos de camarão infectado pela técnica de imunohistoquímica. Na carcinicultura, análises histopatológicas de camarões potencialmente infectados por vírus ou outros patógenos são rotineiramente realizadas. Entretanto, a simples análise de lesões teciduais não permite a confirmação do agente etiológico da doença. Resultados obtidos por Hasson e colaboradores (1999) relatam a falsa determinação de agentes infecciosos por simples coloração de cortes histológicos, uma vez que apenas 65% das amostras previamente diagnosticadas como infectadas por TSV por análise histopatológica tiveram a infecção

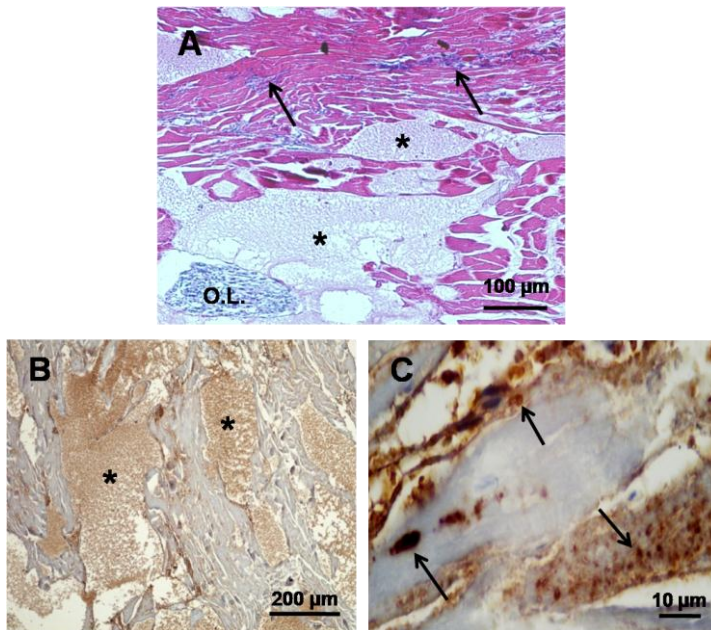
confirmada por hibridização *in situ* (HASSON et al., 1999). Esses dados demonstram que a utilização de ferramentas específicas contra patógenos são estratégias de grande valia, uma vez que permitem o aumento da confiabilidade dos resultados obtidos. Assim como sondas utilizadas nos ensaios de hibridização *in situ*, o uso de AcMo permite um aumento da especificidade de diagnósticos histopatológicos.

Análises imunohistoquímicas de tecidos infectados permitem o diagnóstico da enfermidade. Apesar de técnicas moleculares e de demais imunoenaios - tais como imunodot-blot e Western-blot - serem mais facilmente aplicados, os dados conferidos pela imunohistoquímica permitem identificar especificamente a distribuição do vírus em diferentes órgãos e tecidos do camarão. Ademais, observou-se que sítios de replicação do WSSV podem estar localizados em áreas restritas ao longo do corpo do camarão, repercutindo em resultados falso-negativos por técnicas que requerem uma pequena amostragem do material infectado (PERAZZOLO, comunicação pessoal). Assim, avaliar a eficiência dos AcMo contra IMNV por imunohistoquímica apresenta uma potencial contribuição no entendimento da biologia desse vírus.

As análises histopatológicas dos animais processados neste trabalho identificaram sinais característicos de infecções atribuídas ao IMNV (Figura 18), sendo semelhantes ao perfil histopatológico previamente descrito por Poulos e colaboradores (2006). Nos estágios iniciais do dano tecidual, o tecido muscular esquelético do abdômen de camarões infectados apresentou corpúsculos de inclusão viral basofílicos no citoplasma de células musculares. Os corpúsculos de inclusão viral são a principal estrutura de reconhecimento dos anticorpos, sendo essa marcação determinante para identificar a positividade dos AcMo contra IMNV, como evidenciado pela figura 18C.

Com a disseminação dos vírus pelas células musculares, as fibras musculares passam a exibir um quadro de fibrose que, subsequentemente, culmina na lise celular. Em estágios mais avançados da mionecrose, uma vasta parcela do tecido sofre necrose coagulativa que se distingue pela total destruição do

tecido. Os anticorpos apresentam forte reatividade nessa área de necrose coagulativa, pois, uma vez que a lise celular decorreu de uma intensa replicação viral, partículas ou proteínas virais ainda residem no local e, por isso, são reconhecidas pelos AcMo (Figuras 18B e 18C). Os cortes histológicos também evidenciam a ocorrência de infiltração hemocítica nos tecidos que, em muitos casos, pode repercutir no agrupamento de hemócitos em estrutura esferóides chamadas de ‘órgãos linfóides’ (O.L.) (Figura 18A).



**Figura 18.** Histopatologia de tecido muscular esquelético de camarões infectados com IMNV e perfil de reatividade dos AcMo positivos contra o vírus por imunohistoquímica. (A) Cortes corados com H&E; (B, C) visão geral e aproximada da forte reatividade dos AcMo em áreas de necrose coagulativa (asteriscos) e nos corpúsculos de inclusão viral localizados em áreas de fibrose muscular (setas). O.L.= órgão linfóide associado à infiltração de hemócitos nos tecidos.



A reatividade dos AcMo frente a tecidos de camarão infectado e não-infectado em análises de imunohistoquímica pode ser observado na figura 19, cujos resultados estão sumarizados na tabela 2. Verificou-se que os AcMo anti-rIMNV<sub>105-297</sub> 4.6C e 1.3H apresentaram reatividade em área de mionecrose de tecidos infectados por IMNV, não reagindo inespecificamente com tecidos não infectados. O mesmo padrão foi observado para os AcMo anti-rIMNV<sub>300-527</sub> 1.8C, 2.9E, 3.3A e 11.2D. Esses anticorpos já haviam demonstrado positividade e especificidade contra tecido de camarão infectado nos demais ensaios realizados e, a partir dos ensaios de imunohistoquímica, também foi possível certificar a viabilidade de suas utilizações nesse tipo de técnica.

Embora os AcMo anti-rIMNV<sub>105-297</sub> 5.4H e anti-rIMNV<sub>300-527</sub> 1.3G terem ligado-se especificamente com lisado de tecido de camarão infectado por IMNV nos ensaios de imunodot-blot e Western-blot, esses apresentaram reatividade com componentes presentes entre os feixes muscular de tecidos infectados, localização na qual se encontra tecido conjuntivo e possíveis componentes da hemolinfa. Além disso, o AcMo 1.3G apresentou reatividade contra tecido não-infectado, o que descartou a utilização de ambos anticorpos em futuros testes de diagnósticos a serem confeccionados.

O AcMo anti-rIMNV<sub>300-527</sub> 9.8D ligou-se em corpúsculos de inclusão viral presentes em regiões de mionecrose, mas, no entanto, ele também se ligou a tecido não-infectado. Esses resultados corroboram os resultados obtidos nos ensaios de Western-blot, uma vez que o AcMo 9.8D, além de reconhecer a proteína do capsídeo do IMNV, havia se ligado a outras proteínas.

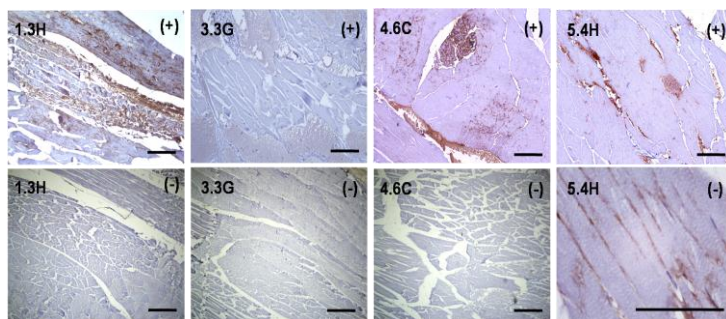
Os AcMo anti-rIMNV<sub>105-297</sub> 3.3G não apresentou reatividade contra tecido infectado e não-infectado. Esse resultado coincide com o obtido por Western-blot. No entanto, esse anticorpo havia demonstrado positividade no ensaio de imunodot-blot e, possivelmente, o epítipo por ele reconhecido foi modificado tanto no processo de eletroforese em condições desnaturantes quanto no procedimento de fixação. Sabe-se que o formaldeído, um dos componentes do fixador de Davidson,

promove a agregação de proteínas teciduais, podendo, portanto, modificar a conformação nativa da proteína ou encobrir os epítomos reconhecidos pelos anticorpos (PUCHTLER; MEIOAN, 1985). Contudo, estudos demonstram que as alterações alostéricas promovidas pelo uso de fixadores não alteram a estrutura secundária das proteínas (MASSON; O'LEARY, 1991). Não obstante, os resultados obtidos neste trabalho demonstram que, na maioria dos casos, o reconhecimento dos antígenos pelos AcMo não foi alterado mediante diferentes condições de tratamento das amostras, o que demonstra que o procedimento de remoção do fixador foi eficiente. Resultados similares foram obtidos em outros estudos afins, porém utilizando-se TSV, IHHNV e WSSV (SITHIGORNGUL et al., 2009; CHAIVISUTHANGKURA et al., 2010 a,b).

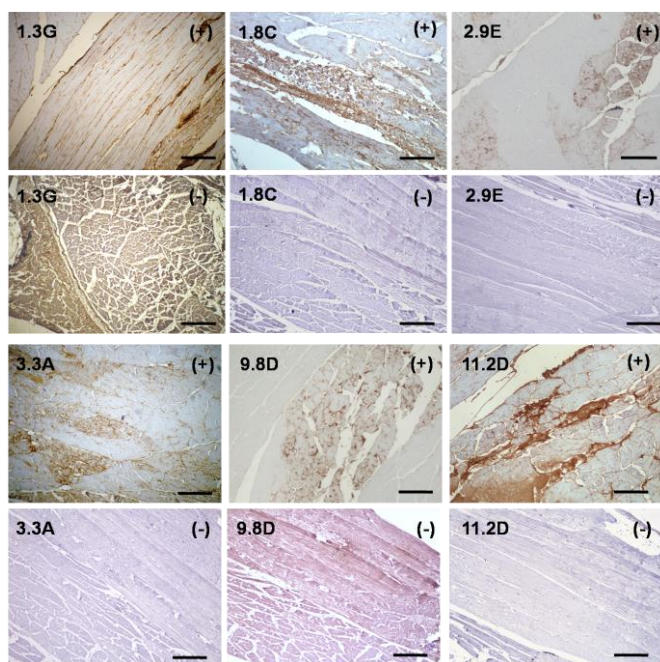
---

**Figura 19.** Panorama de reatividade dos AcMo anti-rIMNV<sub>105-297</sub> e anti-rIMNV<sub>300-527</sub> contra tecidos infectados ou não com IMNV por imunohistoquímica. Cortes de tecido muscular esquelético infectado por IMNV (+) ou não-infectado (-) incubados com sobrenadante de cultura contendo AcMo anti-rIMNV<sub>105-297</sub> (A) ou AcMo anti-rIMNV<sub>300-527</sub> (B), seguido de incubação com anticorpos conjugado com peroxidase e coloração por 3,3-diaminobenzidine e contracoloração com hematoxilina de Harris. Barras correspondentes a 200 µm.

A



B



Concluindo, este trabalho foi o primeiro a desenvolver AcMo que reconheçam o IMNV, um vírus que acomete camarões e que causa grandes perdas no cultivo. Concomitante à publicação dos dois artigos resultantes deste estudo (BORSA et al., 2011; SEIBERT et al., 2011), Kunanopparat e colaboradores (2011) publicaram o desenvolvimento de AcMo contra IMNV que foram capazes de reconhecer o vírus por diferentes técnicas. Nesse estudo, três fragmentos gênicos da proteína do capsídeo do IMNV, CP-N (nucleotídeos 2.248–3.045), CP-I (nucleotídeos 3.046–3.954) e CP-C (nucleotídeos 3.955–4.953), foram amplificados e clonados em *E. coli* para posterior expressão. Os fragmentos CP-N e CP-I localizam-se em regiões equivalentes a IMNV<sub>105-297</sub> e IMNV<sub>300-527</sub>, respectivamente. A partir da imunização de animais com os fragmentos e obtenção de hibridomas, dois AcMo contra CP-N e um contra CP-C foram obtidos, sendo esses específicos contra IMNV, pois não apresentaram reatividade com demais vírus que infectam camarões; AcMo contra CP-I não foram obtidos. Os autores discutem que a possível razão para esse insucesso na produção de AcMo contra esse fragmento seja devido à sua menor imunogenicidade. Contudo, resultados obtidos nessa dissertação demonstram que essa região é bastante imunogênica, uma vez que se obtiveram resultados satisfatórios com rIMNV<sub>300-527</sub>, não sendo, portanto, plausível a hipótese apontada pelos autores. Testes de sensibilidade por imunodot-blot identificaram sensibilidade dos AcMo em torno de 500 pg, resultados similares aos encontrados para muitos dos AcMo aqui desenvolvidos. Ademais, os autores identificaram que as sensibilidades nos testes por imunodot-blot foram dez vezes menores que por RT-PCR. Por imunohistoquímica, Kunanopparat e colaboradores identificaram que não apenas tecido muscular infectado poderia apresentar reatividade com AcMo específicos, mas também órgãos linfóides, brânquias, coração, hemócitos e tecido conjuntivo (KUNANOPPARAT et al., 2011).

Os AcMo anti-rIMNV<sub>105-297</sub> 1.3H e 4.6C e AcMo anti-rIMNV<sub>300-527</sub> 1.8C, 2.9E, 3.3A e 11.2D do presente trabalho foram os que se apresentaram mais recomendados para a

confecção de futuros *kits* de diagnóstico, uma vez que os ensaios de imunodot-blot, Western-blot e imunohistoquímica revelaram suas elevadas sensibilidades e especificidades contra tecido de camarão infectado com IMNV.

Futuramente, esses AcMo serão avaliados quanto a sua especificidade frente a diferentes vírus de camarão. Após essa confirmação, iniciar-se-á um processo de produção em maior escala desses anticorpos com o intuito de desenvolver um teste imunocromatográfico que forneça um diagnóstico rápido, aplicável em campo por pessoas sem treinamento prévio e de baixo custo. Ao ser incluído na rotina da fazenda, esse teste imunocromatográfico poderá se tornar uma ferramenta importante para o diagnóstico precoce do IMNV, diminuindo as perdas no cultivo e elevando os lucros na produção.



## SUMÁRIO DE RESULTADOS

- Os iniciadores desenhados para IMNV<sub>105-297</sub> e IMNV<sub>300-527</sub> amplificaram produtos de 598 e 697 pares de bases, respectivamente;
- As sequências nucleotídicas e aminoácídicas deduzidas de IMNV<sub>105-297</sub> e IMNV<sub>300-527</sub> apresentam elevada identidade de 99 e 98% com sequências de IMNV isolados do Brasil e da Indonésia, respectivamente;
- As expressões de rIMNV<sub>105-297</sub> e rIMNV<sub>300-527</sub> em *E. coli* BL21(DE3) foram bem sucedidas, gerando proteínas de ~ 25 kDa e ~ 30 kDa, respectivamente;
- As condições de temperatura e tempo de indução escolhidas para a expressão de rIMNV<sub>105-297</sub> e rIMNV<sub>300-527</sub> foram de 15h a 27°C e 4h a 37°C, respectivamente;
- rIMNV<sub>105-297</sub> e rIMNV<sub>300-527</sub> apresentaram-se nas frações insolúveis dos extratos bacterianos;
- A purificação de rIMNV<sub>105-297</sub> e rIMNV<sub>300-527</sub> demonstrou-se eficiente quando utilizado o tratamento com solução desnaturante seguido de cromatografia de afinidade por íons metálicos;
- O esquema de imunização utilizado induziu significativa resposta humoral;

- Após processo de fusão, seleção e clonagem de hibridomas, obtiveram-se seis AcMo anti-rIMNV<sub>105-297</sub> e dez AcMo anti-rIMNV<sub>300-527</sub>;
- A isotipagem dos AcMo anti-rIMNV<sub>105-297</sub> revelou uma predominância de IgM; os isotipos IgG2a e IgG2b foram os mais prevalentes dentre os AcMo anti-rIMNV<sub>300-527</sub>;
- A sensibilidade de reação dos AcMo contra as respectivas proteínas recombinantes variou entre 0,05-6,25 ng no ELISA e 0,1-6,25 ng no imunodot-blot;
- Do total de 16 AcMo, treze foram específicos contra tecidos de camarão infectado nos ensaios de imunodot-blot, apresentando reatividade entre 5 e 225 ng de proteínas totais do lisado de tecido muscular abdominal infectado por IMNV;
- AcMo anti-rIMNV<sub>105-297</sub> 1.3H, 4.6C e 5.4H e AcMo anti-IMNV<sub>300-527</sub> 1.3G, 1.8C, 2.9E, 3.3A e 11.2D foram capazes de especificamente detectar uma banda proteica de ~ 100 kDa por Western-blot, cuja massa molecular corresponde à proteína do capsídeo do IMNV;
- AcMo anti-IMNV<sub>105-297</sub> 1.3H e 4.6C e AcMo anti-IMNV<sub>300-527</sub> 1.8C, 2.9E, 3.3A e 11.2D apresentaram reatividade contra os corpúsculos de inclusão viral nas análises por imunohistoquímica.



## CONCLUSÃO

Os AcMo anti-IMNV<sub>105-297</sub> 1.3H e 4.6C e AcMo anti-IMNV<sub>300-527</sub> 1.8C, 2.9E, 3.3A e 11.2D foram os que apresentaram maiores especificidades e sensibilidades nos imunoensaios de imunodot-blot, Western-blot e imunohistoquímica e são, portanto, potenciais ferramentas no desenvolvimento de testes rotineiros para diagnóstico do IMNV.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCC – Associação Brasileira de Criadores de Camarão. Evolução do Desempenho da Carcinicultura Brasileira, 2007. Disponível dia: <[http://www.abccam.com.br/estatisticas\\_nacionais2.html](http://www.abccam.com.br/estatisticas_nacionais2.html)>, Acesso em 13 de mar. De 2011.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFER, A. A.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

ANDRADE, T. P. D.; SRISUVAN, T.; TANG, K. F. J.; LIGHTNER, D. V. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction assay using TaqMan probe for detection and quantification of Infectious myonecrosis virus (IMNV). **Aquaculture**, v. 264, p. 9-15, 2007.

ANDRADE, T. P. D.; REDMAN, R. M.; LIGHTNER, D. V. Evaluation of the reservation of shrimp samples with Davidson's AFA fixative for infectious myonecrosis virus (IMNV) in situ hybridization. **Aquaculture**, v. 278, p. 179-183, 2008.

ANDRADE, T. P.; LIGHTNER, D. V. Development of a method for the detection of infectious myonecrosis virus by reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification and nucleic acid lateral flow hybrid assay. **Journal of Fish Diseases**, v. 32, n. 11, p. 911-924, 2009.

ANIL, T. M.; SHANKAR, K. M.; MOHAN, C. V. Monoclonal antibodies developed for sensitive detection and comparison of white spot syndrome virus isolates in India. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 51, p. 67-75, 2002.

BANEYX, F. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 10, n. 5, p. 411-421, 1999.

BARNES, L. M.; BENTLEY, C. M.; DICKSON, A. J. Stability of protein production from recombinant mammalian cells.

**Biotechnology and Bioengineering**, v. 81, n. 6, p. 631-639, 2003.

BARTAL, A. H.; HIRSHAUT, Y. Current methodologies in hybridoma formation. In: BARTAL, A. H.; HIRSHAUT, Y. (Ed.).

**Methods of Hybridoma Formation**. Clifton: The human press inc., 1987, p. 1-40.

BONAMI, J. R. Shrimp viruses. In: MAHY, B. W. J.; VAN

REGENMORTEL, M. H. V. (eds.). **Encyclopedia of Virology**.

Oxford: Elsevier, 2008, p. 567-576.

BORSA, M.; SEIBERT, C.H. ; ROSA, R.D. ; STOCO, P.H. ; CARGNIN-FERREIRA, E.; PEREIRA, A.M.L.; GRISARD, E.C.; ZANETTI, C.R.; PINTO, A.R. Detection of infectious myonecrosis virus in penaeid shrimps using immunoassays: usefulness of monoclonal antibodies directed to the viral major capsid protein. *Archives of Virology*, v. 156, p. 9-16, 2011.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram

quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

**Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BURNETTI, W. N. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium

dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A.

**Analytical Biochemistry**, v. 112, n. 2, p. 195-203, 1981.

CADORET, J.P.; DEBO, R.; CORNUDELLA, L.; LARDANS, V.;

MORVAN, A.; ROCH, P.; BOULO, V. Transient expression assays with the proximal promoter of a newly characterized actin gene from the oyster *Crassostrea gigas*. **FEBS Letters**, v. 460, p. 81-85, 1999.

CHART, H.; SMITH, H. R.; LA RAGIONE, R. M.; WOODWARD, M. J. An investigation into the pathogenic properties of *Escherichia coli* strains BLR, BL21, DH5a and EQ1. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, p. 1048-1058, 2000.

CIANFRIGLIA, M.; NUTI, M.; TURCHI, V.; BARCA, S.; TOMBESI, M.; MORRONE, S.; CENCIARELLI, C.; NATALI, P. G. High frequency production of hybridomas secreting antibodies to cell antigens. **Hybridoma**, v. 6, n. 6, p. 673-677, 1987.

CHAIVISUTHANGKURA, P.; TANGKHABUANBUTRA, J.; LONGYANT, S.; SITHIGORNGUL, W.; RUKPRATANPORN, S.; MENASVETA, P.; SITHIGORNGUL, P. Monoclonal antibodies against a truncated viral envelope protein (VP28) can detect white spot syndrome virus (WSSV) infections in shrimp. **Science Asia**, v. 30, p. 359-363, 2004.

CHAIVISUTHANGKURA, P.; LONGYANT, S.; HAJIMASALAEH, W.; SRIDULYAKUL, P.; RUKPRATANPORN, S.; SITHIGORNGUL, P. Improved sensitivity of Taura syndrome virus immunodetection with a monoclonal antibody against the recombinant VP2 capsid protein. **Journal of Virological Methods**, v. 163, p. 433-439, 2010 a.

CHAIVISUTHANGKURA, P.; LONGYANT, S.; RUKPRATANPORN, S.; SRISUK, C.; SRIDULYAKUL, P.; SITHIGORNGUL, P. Enhanced white spot syndrome virus (WSSV) detection sensitivity using monoclonal antibody specific to heterologously expressed VP19 envelope protein. **Aquaculture**, v. 299, p. 15-20, 2010 b.

COELHO, M. G. L.; SILVA, A. C. G.; VILA NOVA, C. M. V.; NETO, J. M. O.; LIMA, A. C. N.; FEIJO, R. G.; APOLINARIO, D. F.; MAGGIONI, R.; GESTEIRA, T. C. V. Susceptibility of the wild southern Brown shrimp (*Farfantepenaeus subtilis*) to infectious hipodermal and hematopoietic necrosis (IHHN) and infectious myonecrosis (IMN). **Aquaculture**, v. 294, p. 1-4, 2009.

COSTA, A. M.; BUGLIONE, C. C.; BEZERRA, F. L.; MARTINS, P. C. C.; BARRACCO, M. A. Immune assessment of farm-reared *Penaeus vannamei* shrimp naturally infected by IMNV in NE Brazil. **Aquaculture**, v. 291, n. 3-4, p. 141-146, 2009.

COVARRUBIAS, M. S. M. **Enfermedades del Camarón. Detección Mediante Análisis en Fresco e Histopatología**. México: Trillas, 2010, pp. 180.

ERICKSON, H. S.; ZARAIN-HERZBERG, M.; LIGHTNER, D. V. Detection of Taura syndrome virus (TSV) strain differences using selected diagnostic methods: diagnostic implications in penaeid shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 52, p. 1-10, 2002.

ESHAGHI, M.; TAN, W. S.; CHIN, W. K.; YUSOFF, K. Purification of the extra-cellular domain of Nipah virus glycoprotein produced in *Escherichia coli* and possible application in diagnosis. **Journal of Biotechnology**, v. 116, p. 221-226, 2005.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Based-calling of automated sequencer traces using phred I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, p. 175-185, 1998.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **The State of World Aquaculture 2006**. 1. ed. Rome: FAO Fisheries Technical Paper, 2006.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **State of World Fisheries and Aquaculture 2008**. Rome: FAO Fisheries Technical Paper, 2009.

GOLDSBY, R. A.; KINDT, T. J.; OSBORNE, B. A. Imunoglobulinas: estrutura e função. In: \_\_\_\_\_. **Kuby Imunologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Editora Revinter, p. 83-113, 2002.

GRANT, S. G. N.; JESSEE, J.; BLOOM, F. R.; HANAHAN, D. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. **Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.**, v. 87, p. 4645-4649, 1990.

HASSON, K. W.; HASSON, J.; AUBERT, H.; REDMAN, R. M.; LIGHTNER, D. V. A new RNA-friendly fixate for preservation of penaeid shrimp samples for virological detection using cDNA genomic probes. **Journal of Virological Methods**, v. 66, p. 227-236, 1997.

HASSON, K. W.; LIGHTNER, D. V.; MARI, J.; BONAMI, J. R.; POULOS, B. T.; MOHNEY, L. L.; REDMAN, R. M.; BROCK, J. A. The geographic distribution of Taura Syndrome Virus (TSV) in the Americas: determination by histopathology and in situ hybridization using TSV-specific cDNA probes. **Aquaculture**, v. 171, p. 13-26, 1999.

HOCKNEY, R. C. Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*. **Trends Biotechnology**, v. 12, p. 456-463, 1994.

HOWARD, G. C.; MATHEW, R. K. **Making and Using Antibodies: a Practical Handbook**. Florida: CRC Press, 2007, pp. 411.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: a DNA sequence assembly program. **Genome Research**, v. 9, p. 868-877, 1999.

HUMASON, G. L. **Animal Tissue Techniques**. 4. ed. San Francisco: W. H. Freeman and Company, 1972.

INTORASOOT, S.; TANAKA, H.; SHOYAMA, Y.; LEELAMANIT, W. Characterization and diagnostic use of a recombinant single-chain antibody specific for the gp116 envelop glycoprotein of Yellow head virus. **Journal of Virological Methods**, v. 143, n. 2, p. 186-193, 2007.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. **Nature**, v. 256, p. 495-497, 1975.

KUNANOPPARAT, A.; CHAIVISUTHANGKURA, P.; SENAPIN, S.; LONGYANT, S.; RUKPRATANPORN, S.; FLEGEL, T. W.; SITHIGORNGUL P. Detection of infectious myonecrosis virus using monoclonal antibody specific to N and C fragments of the capsid protein expressed heterologously. **Journal of Virological Methods**, v. 171, n. 1, p. 141-148, 2011.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LIGHTNER D. V.; REDMAN R. M. Shrimp disease and current diagnosis methods. **Aquaculture**, v. 164, p. 201-220, 1998.

LIGHTNER, D. V. The penaeid shrimp viral pandemics due to IHHNV, WSSV, TSV and YHV. History in the Americas and current status. **Aquaculture Panel Meeting**, p. 6-24, 2003.

LIGHTNER, D. V.; PANTOJA, C. R.; POULOS, B. T.; TANG, K. F. J.; REDMAN, R. M.; ANDRADE, T. P.; BONAMI, J. R. Infectious Myonecrosis, New disease in pacific white shrimp. **Global Aquaculture Advocate**, v. 7, p. 85, 2004.

LIGHTNER, D. V. Virus diseases of farmed shrimp in the Western Hemisphere (the Americas): A review. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 106, p. 110-130, 2011.

LIU, W.; WANG, Y. T.; TIAN, D. S.; YIN, Z. C.; KWANG, J. Detection of white spot syndrome virus (WSSV) of shrimp by means of monoclonal antibodies (MAbs) specific to an envelope protein (28 kDa). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 49, p. 11-8, 2002.

LIU, H.; SÖDERHÄLL, K.; JIRAVANICHPAISAL, P. Antiviral immunity in crustaceans. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 27, n. 2, p. 79-88. 2009.



LONGYANT, S.; RUKPRATANPORN, S.;  
CHAIVISUTHANGKURA, P.; SUKSAWAD, P.; SRISUK, C.;  
SITHIGORNGUL, W.; PIYATIRATITIVORAKUL, S.;  
SITHIGORNGUL, P. Identification of *Vibrio* spp. In vibriosis  
*Penaeus vannamei* using developed monoclonal antibodies. **Journal  
of Invertebrate Pathology**, v. 98, p. 63–68, 2008 a.

LONGYANT, S.; POYOL, P.; CHAIVISUTHANGKURA, P.;  
TEJANKURA, T.; SITHIGORNGUL, W.; SITHIGORNGUL, P.;  
RUKPRATANPORN, S. Specific monoclonal antibodies raised  
against Taura syndrome virus (TSV) capsid protein VP3 detect TSV  
in single and dual infections with white spot syndrome virus  
(WSSV). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 79, p. 75–81, 2008 b.

LUCAS, L. J.; BATEY, R. T.; DOUDNA, J. A. Large-scale  
purification of a stable form of recombinant tobacco etch virus  
protease. **BioTechniques**, v. 30, p. 544–554, 2001.

MARCO, A.; VIGH, L.; DIAMANT, S.; GOLOUBINOFF, P.  
Native folding of aggregation-prone recombinant proteins in  
*Escherichia coli* by osmolytes, plasmid- or benzyl alcohol  
overexpressed molecular chaperones. **Cell Stress & Chaperones**, v.  
10, p. 329–339, 2005.

MARKS, H.; GOLDBACH, R. W.; VLAK, J. M.; VAN HULTEN,  
M. C. W. Genetic variation among isolates of white spot syndrome  
virus. **Archives of Virology**, v. 149, p. 673–697, 2004.

MASON, J. T.; O'LEARY, T. J. Structure: A Calorimetric and  
Infrared Spectroscopic Investigation. **Journal of Histochemistry  
and Cytochemistry**, v. 39, n. 2, p. 225–229, 1991.

NIBERT, M. L. '2a-like' and 'shifty heptamer' motifs in penaeid  
shrimp infectious myonecrosis virus, a monosegmented double-  
stranded RNA virus. **Journal of General Virology**, v. 88, p. 1315-  
1318, 2007.

NUNES, A. J. P.; SURESH, A. V. Marine shrimp farming in northeastern Brazil. **World Aquaculture**, p. 32–36, 66–67, 2001.

NUNES, A. J. P.; MARTINS, P. C. C.; GESTEIRA, T. C. V. Carcinicultura ameaçada: produtores sofrem com as mortalidades decorrentes do Vírus da Mionecrose Infecciosa (IMNV). **Panorama da Aquicultura**, v. 14, p. 37-51, 2004.

OIE (World Organization for Animal Health). **Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2009**. Paris: OIE, 2009.

PAEK, S. H.; LEE, S. H.; CHO, J. H.; KIM, Y. S. Development of rapid one-step immunochromatographic assay. **Methods**, v. 22, p. 53-60, 2000.

PEREIRA, A. M. L.; MENDES, E. S.; GESTEIRA, T. C. V. Mionecrosis infecciosa viral (IMNV) y sus implicaciones en los cultivos de camarones brasilenos. In: MORALES, V.; CÜELLAR-ANJEL, J. (eds.). **Guía Técnica - Patología e inmunología de camarones penaeidos**. Panamá: Programa CYTED Red II-D Vannamei, 2008, p. 96-103.

PINHEIRO, A. C. A. S.; LIMA, A. P. S.; SOUZA, M. E.; NETO, E. C. L.; ADRIÃO, M.; GONÇALVES, V. S. P.; COIMBRA, M. R. M. Epidemiological status of Taura syndrome and Infectious myonecrosis viruses in *Penaeus vannamei* reared in Pernambuco (Brazil). **Aquaculture**, v. 262, p. 17–22, 2007.

POULOS, B. T.; LIGHTNER, D. V.; TRUMPER, B.; BONAMI, J. R. Monoclonal Antibodies to a Penaeid Shrimp Parvovirus, Infectious Hypodermal and Hematopoietic Necrosis Virus (IHHNV). **Journal of Aquatic Animal Health**, v. 6, p. 149-154, 1994.

POULOS, B. T.; PANTOJA, C. R.; BRADLEY-DUNLOP, D.; AGUILAR, J.; LIGHTNER, D. V. Development and application of monoclonal antibodies for the detection of white spot syndrome virus of penaeid shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 47, p. 13-23, 2001.

POULOS, B. T.; LIGHTNER, D. V. Detection of infectious myonecrosis virus (IMNV) of penaeid shrimp by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). **Disease of Aquatic Organisms**, v. 73, p. 69-72, 2006.

POULOS, B. T.; TANG, K. F. J.; PANTOJA, C. R.; BONAMI, J. R.; LIGHTNER, D. V. Purification and characterization of infectious myonecrosis virus of penaeid shrimp. **Journal of General Virology**, v. 87, p. 987-996, 2006.

PUCHTLER, H.; MEIOAN, S.N. On the chemistry of formaldehyde fixation and its effects on immunohistochemical reactions. **Histochemistry**, v. 82, p. 201-204, 1985.

PUTHAWIBOOL, T.; SENAPIN, S.; KIATPATHOMCHAI, W.; FLEGEL, T. W. Detection of shrimp infectious myonecrosis virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. **Journal of Virological Methods**, v. 156, p. 27-31, 2009.

ROCHA, I. P. Panorama da carcinicultura brasileira em 2007. **Panorama da Aquicultura**, v. 17, p. 26-31, 2007.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor, 2001.

SEIBERT, C.H.; BORSA, M.; ROSA, R.D.; CARGNIN-FERREIRA, E.; PEREIRA, A.M.L.; GRISARD, E.C.; ZANETTI, C.R.; PINTO, A.R. Detection of major capsid protein of infectious myonecrosis virus in shrimps using monoclonal antibodies. **Journal of Virological Methods**, 169, 169-175, 2010.

SEIFFERT, W. Q.; BELTRAME, E.; ANDREATTA, E. R.; MAGGIONI, D. S. Enfermidades: uma oportunidade para repensar o cultivo de camarões marinhos. **Panorama da Aquicultura**, v. 16, p. 32-38, 2006.

SENAPIN, S.; PHEWSAIYA, K.; BRIGGS, M.; FLEGEL, T. W. Outbreaks of infectious myonecrosis virus (IMNV) in Indonesia confirmed by genome sequencing and use of an alternative RT-PCR detection method. **Aquaculture**, v. 266, p. 32-38, 2007.

SHI, S. R.; KEY, M. E.; KALRA, K. L. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 39, n. 6, p. 741-748, 1991.

SILVA, V. A.; SANTOS, F. L.; BEZERRA, S. S.; PEDROSA, V. F.; MENDES, P. P.; MENDES, E. S. A multi-season survey for infectious myonecrosis in farmed shrimp, *Litopenaeus vannamei*, in Pernambuco, Brazil. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 104, n.3, p. 161-165, 2010.

SITHIGORNGUL, P.; CHAUYCHUWONG, P.; SITHIGORNGUL, W.; LONGYANT, S.; CHAIVISUTHANGKURA, P.; MENASVETA, P. Development of a monoclonal antibody specific to yellow head virus (YHV) from *Penaeus monodon*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 42, p. 27-34, 2000.

SITHIGORNGUL, W.; RUKPRATANPORN, S.; PECHARABURANIN, N.; LONGYANT, S.; CHAIVISUTHANGKURA, P.; SITHIGORNGUL, P. A simple and rapid immunochromatographic test strip for detection of white spot syndrome virus (WSSV) of shrimp. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 72, p. 101-106, 2006.

SITHIGORNGUL, W.; RUKPRATANPORN, S.; SITTIDILOKRATNA, N.; PECHARABURANIN, N.; LONGYANT, S.; CHAIVISUTHANGKURA, P.; SITHIGORNGUL, P. A convenient immunochromatographic test strip for rapid diagnosis of yellow head virus infection in shrimp. **Journal of Virological Methods**, v. 140, p. 193-199, 2007.

SITHIGORNGUL, P.; HAJIMASALAEH, W.; LONGYANT, S.; SRIDULYAKUL, P.; RUKPRATANPORN, S.; CHAIVISUTHANGKURA, P. Simple immunoblot and immunohistochemical detection of *Penaeus stylirostris* densovirus using monoclonal antibodies to viral capsid protein expressed heterologously. **Journal of Virological Methods**, v. 162, n. 1-2, p. 126-132, 2009.

SONG, Y. L.; YU, C. I.; LIEN, T. W.; HUAN, C. C.; LIN, M. N. Haemolymph parameters of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) infected with Taura syndrome virus. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 14, p. 317-331, 2003.

SORENSEN, H. P.; MORTENSEN, K. K. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. **Journal of Biotechnology**, v. 115, p. 113-128, 2005.

STILLS, J. F. Adjuvants and antibody production: Dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. **Institute For Laboratorial Research Journal**, v. 46, p. 280-293, 2005.

TAGGART, R. T.; SAMLOFF, I. M. Stable antibody-producing murine hybridomas. **Science**, v. 219, n. 4589, p. 1228-1230, 1983.

TAN, Y.; XING, Y.; ZHANG, H.; FENG, Y.; ZHOU, Y.; SHI, Z. L. Molecular detection of three shrimp viruses and genetic variation of white spot syndrome virus in Hainan Province, China, in 2007. **Journal of Fish Diseases**, v. 32, p. 777-784, 2009.

TANG, K. F. J.; PANTOJA, C. R.; POULOS, B. T.; REDMAN, R. M.; LIGHTNER, D. V. In situ hybridization demonstrates that *Litopenaeus vannamei*, *L. stylirostris* and *Penaeus monodon* are susceptible to experimental infection with infectious myonecrosis virus (IMNV). **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 63, p. 261-265, 2005.

TANG, K. F. J.; PANTOJA, C. R.; REDMAN, R. M.; LIGHTNER, D. V. Development of in situ hybridization and RT-PCR assay for the detection of a nodavirus (PvNV) that causes muscle necrosis in *Penaeus vannamei*. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 75, p. 183–190, 2007.

TANG, K. F. J.; OCHOA, W. F.; SINKOVITS, R. S.; POULOS, B. T.; GHABRIAL, S. A.; LIGHTNER, D. V.; BAKER, T. S.; NIBERT, M. L. Infectious myonecrosis virus has a totivirus-like, 120-subunit capsid, but with fiber complexes at the fivefold axes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.**, v. 105, p. 17526-17531, 2008.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 25, p. 4876–4882, 1997.

VILLAYERDE, A.; CARRIO, M. M. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 1385-1395, 2003.

WANG, X.; ZHAN, W. Developmental of an immunochromatographic test to detect White Spot Syndrome Virus of shrimp. **Aquaculture**, v. 255, p. 196-200, 2006.

WANG, Y.; ZHANG, X.; YUAN, L.; XU, T.; RAO, Y.; LI, J.; DAI, H. Generation of recombinant monoclonal antibodies to study structure–function of envelope protein VP28 of white spot syndrome virus from shrimp. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 372, p. 902–906, 2008.

WONGTEERASUPAYA, C.; PUNGCHAI, P.; WITHYACHUMNARNKUL, B.; BOONSAENG, V.; PANYIM, S.; FLEGEL, T.W.; WALKER, P.J. High variation in repetitive DNA fragment length for white spot syndrome virus (WSSV) isolates in Thailand. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 54, p. 253–257, 2003.

WU, T. T.; KABAT, E. A. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. **Journal of Experimental Medicine**, v. 132, p. 211-250, 1970.

YEH, S. P.; HSIEH, S. L.; CHENG, W.; LIU, C. H. Immune response of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after a concurrent infection with white spot syndrome virus and infectious hypodermal and hematopoietic necrosis virus. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 26, n. 4, p. 582-588, 2009

YOKOYAMA, W. M.; CHRISTENSEN, M.; SANTOS, G.; MILLER, D. Production of monoclonal antibodies. In: COLIGAN, J. E.; BIERE, B. E.; MARGULIES, D. H.; SHEVACH, E. M.; STROBER, W.; COICO, R. (Eds.). **Current Protocols in Immunology**: John Wiley & Sons, 2006, p. 2.5.1-2.5.25.

ZOLA, H. Making hybridomas. In: ZOLA, H. (Ed.). **Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques**. Boca Raton: CRC Press, 1987, p. 23-62.